

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Andres Ainelo

***Pseudomonas putida* GraTA toksiin-antitoksiin süsteemi toimemehhanismide  
selgitamine**

Magistritöö

Juhendaja PhD Rita Hõrak

Tartu 2013

## Sisukord

Sisukord .....	2
Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus .....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid bakterites .....	6
1.2 Tüüp II TA süsteemid.....	7
1.2.1 TA operoni autoregulatsioon .....	8
1.2.2 TA süsteemi toimimine valkude erineva stabiilsuse kaudu .....	11
1.2.3 Translatsiooni inhibeerivad TA süsteemid .....	11
1.2.4 <i>Pseudomonas putida</i> GraTA süsteem .....	13
2. Eksperimentaalne osa .....	16
2.1 Töö eesmärgid .....	16
2.2 Materjal ja meetodika.....	17
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed .....	17
2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) .....	17
2.2.3 Klonimine.....	18
2.2.4 Bakterite elektroporatsioon .....	19
2.2.5 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees .....	19
2.2.6 Valkude ekspressioon ja puhastamine .....	19
2.2.7 His <sub>6</sub> -märgiga valkude detektsioon HisProbe-HRP reagentiga.....	20
2.2.8 Antitoksiini stabiilsuse analüüs.....	21
2.2.9 Radioaktiivmärgisega DNA proovi valmistamine .....	21

2.2.10	<i>Gel mobility shift</i> analüüs .....	22
2.2.11	DNaas I jalajälje reaktsioon .....	22
2.2.12	Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosgradiendis.....	23
2.2.13	<i>In vitro</i> translatsioonikatse .....	24
2.3	Tulemused .....	25
2.3.1	GraT ja GraA moodustavad kompleksi .....	25
2.3.2	Nii GraA kui ka GraT-GraA kompleks seonduvad <i>graTA</i> promootorile .....	27
2.3.3	Antitoksiin GraA on ebatavaliselt stabiilne valk .....	29
2.3.4	GraT mõjutab <i>P. putida</i> ribosoomiprofiili .....	30
2.4	Arutelu.....	34
2.4.1	GraTA on II tüüpi TA süsteem .....	34
2.4.2	GraA on ebatavaliselt stabiilne antitoksiin .....	35
2.4.3	GraT takistab 70S ribosoomide moodustumist 50S subühiku kaudu .....	37
2.4.4	GraTA ei pruugi kuuluda HigBA TA perekonda .....	38
	Kokkuvõte .....	39
	Summary.....	40
	Tänuõnad.....	42
	Kasutatud kirjandus .....	43

## Kasutatud lühendid

BB – blokeerimispuhver (ingl. k. *blocking buffer*)

BSA – veise seerumalbumiin (ingl. k. *bovine serum albumin*)

CPM – radioaktiivsuse loendusi minutis (ingl. k. *counts per minute*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (ingl. k. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

IPTG – isopropüül  $\beta$ -D-1-tiogalaktopüranosiid

LLP – lüüsi-lahjenduspuhver

OD – optiline tihedus (ingl. k. *optical density*)

PA – polüakrüülamiid

PBS – fosfaatpuhver soolaga (ingl. k. *phosphate buffered saline*)

5'-RACE – *rapid amplification of cDNA ends*

SDS – naatriumdodetsüülsulfaat (ingl. k. *sodium dodecyl sulfate*)

TA – toksiin-antitoksiin

TBE – tris-boorhape-EDTA puhver

TBS-T – tris-puhver soola ja Tween 20-ga (ingl. k. *tris buffered saline – Tween*)

TCA – trikloroädikhape (ingl. k. *trichloroacetic acid*)

## Sissejuhatus

Vabalt elavad bakterid peavad suutma vastu pidada tihti muutuvast ja kohati raskete elutingimustega keskkonnas. Et optimeerida oma elutegevust vastavalt hetkeolukorrale, on mikroobidele ühest küljest olulised keskkonna tajumise signaalirajad ning teisalt rakusisesed mehhanismid, mis aitavad kiiresti raku metaboolset seisundit muuta. Bakteri stressivastuse vahendamist peetakse ka genoomsete toksiin-antitoksiin (TA) süsteemide üheks oluliseks rolliks. TA süsteemid koosnevad reeglina kahest komponendist: toksiinist ja antitoksiinist. Toksiinid on pidevalt rakus valmis kasvu peatama, kuid bakterile optimaalse kasvukeskkonna korral takistavad antitoksiinid nende toimimist. Ebasoodsates tingimustes, näiteks toitainete puudusel või antibiootikumide mõjul, antitoksiinid lagundatakse ning inhibitsioonist vabanenud toksiinid osalevad bakteri kasvu pidurdamises.

Erinevate toksiin-antitoksiin süsteemide regulatsioonis ja toimemehhanismides on mitmeid sarnaseid jooni, kuid siiski on iga konkreetne süsteem omapärane. Ühe kitsama toksiiniperekonna raames võib varieeruda näiteks mRNA järjestus, mida toksiin ära tunneb ja lõikab, et selle translatsiooni takistada. Ühest superperekonnast võib aga leida täiesti erineva rakulise sihtmärgi ja toimemehhanismiga toksiine, mis on omavahel siiski selgelt suguluses.

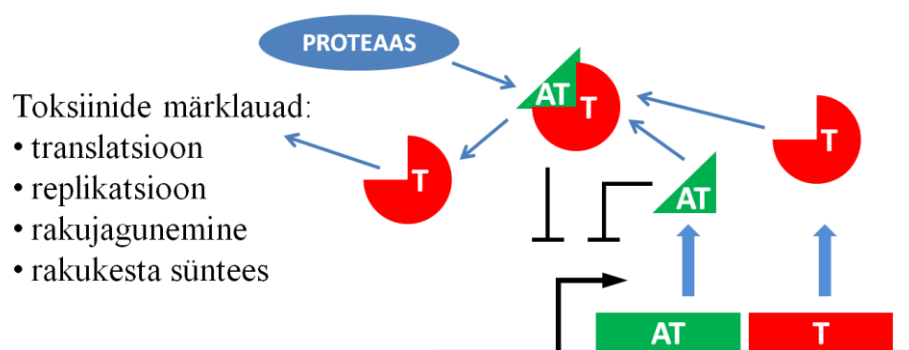
Meie laboris uuritav *Pseudomonas putida* GraTA süsteem on teadaolevalt selles bakteris ja terves pseudomonaadide suures perekonnas esimene praktiliselt kirjeldatud toksiin-antitoksiin süsteem. *In vivo* funktsionaalsed katsed on näidanud, et GraT on toksiin, mis mõjutab bakteri kasvukiirust ning GraA neutraliseerib selle efekti. Samas on toksiini mõju mõõdukas ning optimaalsetel kasvutingimustel suudavad rakud edukalt kasvada ka ilma antitoksiinita, mis on TA süsteemi kohta väga ebaharilik (Tamman, 2012).

Eelnevast lähtuvalt on käesoleva töö eesmärgiks selgitada GraTA süsteemi toimemehhanisme *in vitro* ning võrrelda neid seni kirjeldatud TA süsteemides leitud efektidega.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Toksiin-antitoksiin süsteemid bakterites

Toksiin-antitoksiin (TA) süsteeme kodeerivad operonid on prokarüootides laialt levinud. Reeglina koosnevad TA süsteemid kahest osast: toksiinist, mis kas aeglustab bakteri kasvu või tapab bakteri, ja antitoksiinist, mis ei lase tavaolekus toksiini mõjul avalduda (Hayes, 2003), nagu on kujutatud joonisel 1. Esmalt avastati TA süsteemid plasmiididest kui plasmidi säilimist kindlustavad elemendid. Leiti, et TA süsteemi kandva plasmidi rakust kadumisel pidurdub bakteri kasv ning plasmiidita rakud kas konkureeritakse populatsioonist välja või hukuvad (Ogura ja Hiraga, 1983, Gerdes jt., 1986). TA süsteemide selline toime põhineb toksiini ja antitoksiini erineval stabiilsusel. Kui TA lookus peaks rakust mingil põhjusel kaduma, ei sünteesita TA valke enam juurde. Kuna antitoksiin on labiilsem kui toksiin, laguneb see kiiremini ja alles jääb vaba toksiin, mis pärssib raku elutegevust. Sellise mõju tõttu nimetatakse TA süsteeme ka sõltuvussüsteemideks (Jensen ja Gerdes, 1995).



**Joonis 1.** Klassikalise toksiin-antitoksiin süsteemi ülesehitus. Ühes operonis paiknevad geenid kodeerivad antitoksiini (AT) ja toksiini (T), mis moodustavad rakus kompleksi. Operoni transkriptsiooni repressseerivad nii toksiin-antitoksiin kompleks kui ka vaba antitoksiin. Stressitingimustes lagundavad proteaasid antitoksiini ning toksiin vabaneb, pärssides erinevate märklaudade kaudu raku kasvu.

TA süsteemide edasine uurimine on näidanud, et nende levik ei piirdu ainult plasmiididega. TA lookuseid on leitud nii gramnegatiivsete kui ka grampositiivsete bakterite ja arhede genoomidest. Siiski ei ole TA lookuste levik bakterite genoomides ühtlane: need on väga sagedased vabalt elavates bakterites, kuid puuduvad obligatoorsete parasiitide genoomidest. See viitab, et TA süsteemid on vabalt elavatele bakteritele kasulikud, kuid nende roll ei ole siiani üheselt selge (Pandey ja Gerdes, 2005). Ühe funktsioonina on välja toodud osalemine antibiootikumiresistentsete persistorrakkude tekkes, kusjuures on viiteid, et

seda mõjutavad ühe bakteri mitmed TA süsteemid koos toimiva tervikuna. Näiteks on nähtud, et *E. coli* laboritüves K12 avaldavad persistorite tekkele kumulatiivset mõju 10 genoomset TA süsteemi, kuid iga süsteemi roll eraldi vaadatuna on väga väike (Maisonneuve jt., 2011). Samas on uropatogeenses *E. coli* tüves CFT073 nähtud ka ühe konkreetse TA lookuse, *pasTI*, tugevat efekti persistorite tekkele. Antud tüve genoomis on vähem TA lookuseid kui laboritüvel K12 ja ilmselt kerkib seetõttu iga konkreetse süsteemi mõju paremini esile (Norton ja Mulvey, 2012). Mitmed *E. coli* TA süsteemid osalevad ka bakteri üldise stressivastuse vahendamises ja regulatsioonis (Christensen jt., 2001, Wang jt., 2011). Lisaks võivad kromosomaalsed antitoksiinid aidata neutraliseerida plasmiidseid toksine ja seega toimida nn. sõltuvusvastaste süsteemidena (Saavedra De Bast jt., 2008).

Kõigis teadaolevates TA süsteemides on toksiiniks väike valk, kuid antitoksiini olemus ja toimemehhanism võivad erineda. Seetõttu rühmitatakse TA süsteeme just antitoksiini tüübi järgi. Algselt jaotati TA süsteemid kaheks: tüüp I ja tüüp II. I tüüpi antitoksiinid on väikesed RNA-d, mis paarduvad toksiini mRNAga ja takistavad selle translatsiooni (Fozo jt., 2008). II tüüpi antitoksiinid on valgud, mis inaktiveerivad toksiini sellega seondudes (Hayes, 2003). Praeguseks on kirjeldatud veel kolme liiki süsteeme, kuigi igast liigist on põhjalikumalt uuritud vaid üht lookust. Tüüp III TA süsteemis on antitoksiiniks RNA, mis seondub valgulise toksiiniga (Fineran jt., 2009); tüüp IV antitoksiin seondub toksiini rakulise märklauaga ja kaitseb seda toksiini eest (Tan jt., 2011) ning tüüp V antitoksiin lõikab toksiini mRNA-d, vähendades seeläbi toksiini ekspressiooni (Wang jt., 2012).

## **1.2 Tüüp II TA süsteemid**

Nagu juba mainitud, on II tüüpi TA süsteemides nii toksiiniks kui ka antitoksiiniks valk (Hayes, 2003). Sellised valgupaarid on väga levinud: neid kodeerivaid lookusi on tuvastatud nii plasmiidides kui ka bakterite kromosoomides (Shao jt., 2011) ning need on ühtlasi kõige põhjalikumalt uuritud TA süsteemid (Yamaguchi jt., 2011).

II tüüpi TA süsteemide jaotus on keeruline, kuna vaid biomolekuli olemuse põhjal loodud grupp hõlmab väga erineva struktuuri ja funktsiooniga toksine ja antitoksine (Leplae jt., 2011). Algselt üritati tüüp II toksine ja antitoksine paarikaupa grupeerida ning eristati seitset peamist kahekomponentset ja üht erandlikku kolmeosalist TA-perekonda (Gerdes jt., 2005). Siiski oli juba selleks ajaks teada, et ühe perekonna toksinid võivad esineda koos erineva perekonna antitoksiinidega (Anantharaman ja Aravind, 2003). Kuna sellesisulisi näiteid tuleb üha juurde, on viimasel ajal peetud mõistlikuks toksinide ja antitoksiinide

süsteematikat eraldi käsitleda. Bioinformaatiliste analüüside põhjal on defineeritud 12 toksiinide ja 20 antitoksiinide superperekonda. Seejuures on enamiku toksiiniperekondade puhul selgunud, et nende liikmed võivad moodustada paare kolme või enama erineva perekonna antitoksiinidega (Leplae jt., 2011).

Reeglina on tüüp II toksiinid ja antitoksiinid väikesed, umbes 100 aminohappe pikkused valgud. Neid kodeerivad geenid paiknevad ühes operonis ja võivad tihti omavahel kuni 20 nukleotiidi ulatuses kattuda (Pandey ja Gerdes, 2005). Enamikes süsteemides on antitoksiini geen esimene, mis võimaldab seda võrreldes toksiiniga efektiivsemalt sünteesida (Yamaguchi jt., 2011). Siiski leidub ka geenide vastupidist paigutust: toksiooni geeniga algavad näiteks *higBA* perekonna operonid. Et sellisel juhul tagada labiilsema antitoksiini piisav kogus rakus, on Rts1 plasmidi *higBA* operoni keskel lisapromootor (Gerdes jt., 2005).

Bakteri kasvamisel toitaineterikkas keskkonnas moodustavad toksiin ja antitoksiin rakus kompleksi, mis ei lase toksiinil oma märklauale toimida. Stressitingimustes lagundatakse kompleksist esimesena antitoksiin ning vabanenud toksiin mõjutab raku elutegevust (Yamaguchi jt., 2011). Kuna TA süsteemide jaotamine tüüpidesse käib antitoksiini olemuse järgi, ei ole tüüp II toksiinidel ühtset märklauda. Siiski kerkib kõige levinuma sihtmärgina esile translatsioon: enamik seni uuritud toksine pidurdavad erinevatel viisidel valgusünteesi (Guglielmini ja Van Melder, 2011, Leplae jt., 2011). Peale translatsiooni inhibiitorite kuulub II tüübi alla veel replikatsiooni, rakujagunemist ja rakukesta sünteesi takistavaid toksine (Schuster ja Bertram, 2013). Üldiselt arvatakse, et kuna TA süsteemid levivad bakterites tihti plasmiidide horisontaalse ülekande kaudu, peavadki toksiinide sihtmärkideks olema võimalikult konserveerunud protsessid (Leplae jt., 2011).

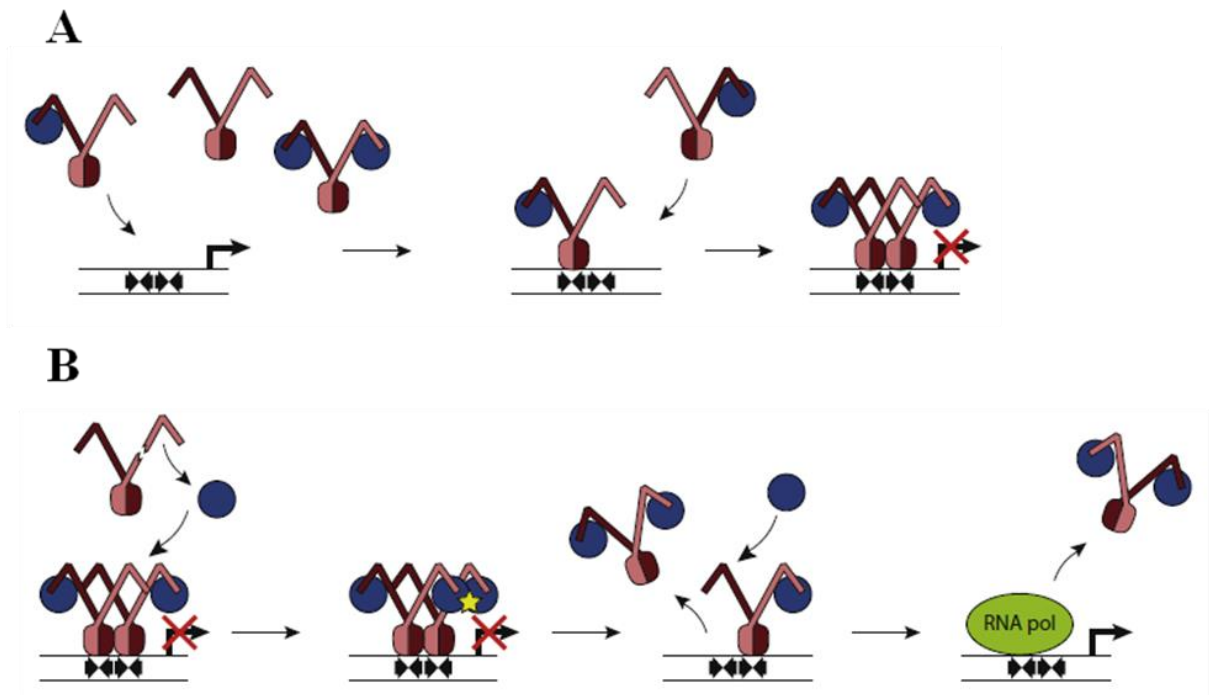
### 1.2.1 TA operoni autoregulatsioon

Tüüp II TA süsteemide puhul on tavaline, et antitoksiin seondub TA operoni promootorile ja represseerib operoni transkriptsiooni. Reeglina asub DNA-d siduv domeen antitoksiini N-terminuses ja on mõne tüüpilise DNA-seondumismotiivi struktuuriga (Blower jt., 2011). Näiteks on antitoksiin HipB-l Xre-HTH (Xre-tüüpi heeliks-pööre-heeliks) domeen (Schumacher jt., 2009) ja CcdA dimeer moodustab RHH (lint-heeliks-heeliks) domeeni (Madl jt., 2006). Operoni promootoralal on antitoksiini seondumiskohaks tihtipeale kas täiuslikult palindroomne järjestus, nagu *E. coli yefM-yoeB* süsteemil (Kedzierska jt., 2007), või lühike pöördkordusjärjestus, nagu *E. coli mqsRA* süsteemil (Brown jt., 2011). MqsA on ka heaks näiteks eripärasest antitoksiinist, millel on DNA-d siduv domeen valgu C-terminaalses osas.



Tihti suudab toksiin-antitoksiin kompleks isegi efektiivsemalt promootoriga seonduda ja TA lookuse transkriptsiooni represseerida kui antitoksiin üksi (Blower jt., 2011). *E. coli mazEF*-süsteemi puhul on nähtud, et toksiini lisamine antitoksiinile suhtes 2:1 suurendab antitoksiin MazE afiinsust DNA suhtes ligikaudu 10 korda, seejuures toksiin üksinda DNA-d ei seo (Zhang jt., 2003). Siiski ei toimi toksiinid ainult korepressoritena, vaid võivad ka repressiooni kõrvaldada. Enamikul seni uuritud juhtudel on leitud, et transkriptsiooni regulatsioon sõltub tugevalt toksiini ja antitoksiini hulkade omavahelisest suhtest ning sellist nähtust nimetatakse tingimuslikuks kooperatiivsuseks (Gerdes ja Maisonneuve, 2012). Üldiselt on leitud, et antitoksiini ja operaator-DNA seondumiskatsetes tõstab toksiini lisamine seondumiseefektiivsust, kuni saavutatakse reaalselt DNA-ga seonduvale heteromultimeerile vastav moolsuhe. Edasine toksiini lisamine lagundab tekkinud valk-DNA kompleksid, kuid selleks vajalik kogus varieerub suuresti. Nii *Salmonella enterica vapBC* kui ka *E. coli* F plasmidi *ccdAB* süsteemi puhul on operoni transkriptsiooni represseerivas kompleksis toksiini ja antitoksiini suhe 1:1. Repressiooni täielikuks eemaldamiseks piisab *ccdAB* puhul suhtest 2:1, kuid *vapBC*-l on selleks vaja vähemalt 16-kordset toksiini ülehulka (Afif jt., 2001, Winther ja Gerdes, 2012).

Arvatakse, et TA operoni regulatsioon tingimusliku kooperatiivsusega aitab rakkudel vältida vaba toksiini taseme juhuslikust kõikumisest tulenevaid efekte. Molekulaarsete mehhanismide uurimine on näidanud, et nii *E. coli relBE* (Bøggild jt., 2012) kui ka profaag P1 *phd/doc* süsteemi (Garcia-Pino jt., 2010) puhul on toksiinil mitu erineva afiinsusega antitoksiini siduvat elementi. Tänu sellele võivad moodustuda erineva stöhhiomeetriaga toksiin-antitoksiin kompleksid, millest kõige toksiinirikkamad ei suuda enam promootoriga seonduda. Nii seotakse liigne vaba toksiin kiirelt ära ja samas käivitub TA-operoni transkriptsioon (joonis 2 B). Transkriptsiooni aktivatsioon tõstab omakorda antitoksiini taset, kuni promootori regulatsioonis taastub algne vaigistatud olukord (joonis 2 A, Garcia-Pino jt., 2010, Bøggild jt., 2012). *E. coli relBE* süsteemi tingimusliku kooperatiivsuse matemaatiline modelleerimine viitas, et kooperatiivsuseefekti tõttu võib toksiini aktivatsioon aminohapetenälja korral ja ka inaktivatsioon toitainetallika taastumisel olla ühe raku tasandil reguleeritud positiivse tagasiside teel. See tähendaks, et kontrollitud üleminek ühest olekust teise toimuks kiiresti ja konkreetset ning samas oleksid mõlemad olekud suhteliselt tundetud valguhulkade juhuslike kõikumiste suhtes (Cataudella jt., 2012).



**Joonis 2.** TA operoni regulatsioon tingimusliku kooperatiivsusega *E. coli* RelBE süsteemi näitel. A. Raku kiire kasvu korral on toksiin RelE-d (sinine) suhteliselt vähem ning iga antitoksiin RelB dimeer (hele- ja tumepruun) seob keskmiselt ühe toksiini molekuli. Ühe RelB<sub>2</sub>-RelE trimeeri seondumine *relBE* operoni promootorile soodustab ka teise trimeeri seondumist, tekkinud heteroheksameer repressseerib operoni transkriptsiooni. B. Toitainetenälja korral lagundatakse labiilsemat antitoksiin RelB-d ja toksiin RelE suhteline hulk tõuseb. Vaba toksiin seondub transkriptsiooni repressseeriva kompleksi ühe RelB<sub>2</sub>-RelE trimeeriga ning põhjustab selle dissotsieerumise DNA-lt. Järelejäänud trimeer eraldub DNA-lt kas täiendavalt vaba toksiini sidudes või RNA polümeraasi mõjul [(Bøggild jt., 2012), muudetud].

Kuigi TA operonide regulatsioon tingimusliku kooperatiivsusega on laialt levinud, leidub ka süsteeme, millel see puudub. Näiteks leiti *E. coli mqsRA* süsteemis vastupidiselt varem arvatule, et toksiin MqsR toimib ainult MqsA-DNA kompleksi lagundajana. Antitoksiin MqsA-l ei ole DNA ja toksiiniga seondumise saidid täiesti eraldi, vaid kattuvad. Lisaks on MqsR-MqsA kompleks väga stabiilne ja antitoksiin seondub eelistatult toksiiniga (Brown jt., 2013). Kuigi siin ei toimu toksiin-antitoksiin kompleksi kooperatiivset seondumist promootoriga, inaktiveeritakse liigne toksiin ikkagi TA-operoni derepressiooni kaudu, mille tulemusena sünteesitakse antitoksiini juurde.

Kuna antitoksiinid on DNA-ga seonduvad valgud, on viimasel ajal leitud ka näiteid, kus antitoksiin ei repressseeri ainult omaenda operoni transkriptsiooni, vaid mõjutab ka teiste geenide avaldumist. *E. coli mqsRA* süsteemi antitoksiin MqsA repressseerib peale *mqsRA* promootori muu hulgas ka statsionaarse faasi sigma faktori RpoS-i geeni, olles seekaudu

otseselt seotud üldise stressivastuse reguleerimisega (Wang jt., 2011). Teine *E. coli* antitoksiin, DinJ, vähendab samuti RpoS-i hulka, kuid teeb seda kaudselt, represseerides RpoS-i positiivse regulaatori CspE geeni promootorit (Hu jt., 2012).

### 1.2.2 TA süsteemi toimimine valkude erineva stabiilsuse kaudu

Toksiin-antitoksiin süsteemide toimimiseks peab antitoksiin stressi korral või plasmidi kaotamisel suhteliselt kiiresti lagundatama. Antitoksiine lagundavad bakterirakus leiduvad ATP-sõltuvad proteaasid (Bukowski jt., 2011). Reeglina lagundab üht antitoksiini üks kindel proteaas, milleks *E. coli* antitoksiinide puhul on tavaliselt kas Clp või Lon (Gerdes jt., 2005). Mõnel juhul võib kasvutingimustest sõltuvalt toimida erinev proteaas: *E. coli* MazE antitoksiini lagundab stabiilse kasvu korral ClpXP (Aizenman jt., 1996) ja aminohapete nälja korral Lon proteaas (Christensen jt., 2003). Mitmetel antitoksiinidel on toksiini siduv domeen vabas olekus korrapäratu ning omandab kindla sekundaarstruktuuri alles kompleksis toksiiniga (Yamaguchi jt., 2011). Struktuuritu valguosa on heaks substraadiks proteaasidele ja soodustab seega vaba antitoksiini lagundamist (Donegan jt., 2010).

Erinevate TA süsteemide antitoksiinid on väga erineva elueaga. *E. coli* antitoksiini RelB elueaks rakus loetakse ligikaudu 4,3 minutit (Cataudella jt., 2012), *Streptococcus pyogenes*-e pSM19035 plasmidi  $\omega$ - $\epsilon$ - $\zeta$  süsteemis on antitoksiini  $\epsilon$  poolestusaeg 18 minutit (Camacho jt., 2002) ja profaag P1 *phd/doc* süsteemis väheneb Phd antitoksiini kogus poole võrra alles 120 minutiga, mis katsetingimustel vastab kahele generatsiooniajale (Lehnherr ja Yarmolinsky, 1995). Viimasel juhul arvatakse, et antitoksiini suhteliselt pikk eluiga võib siluda juhuslikke kõikumisi geeniekspressioonis ja takistada sellest tulenevat toksiini ekslikku aktivatsiooni (Lehnherr ja Yarmolinsky, 1995).

Toksiinid on antitoksiinidest oluliselt pikemaelised valgud. Kui RelB eluiga oli ~4,3 minutit, siis RelE püsib rakus umbes 43 minutit. Seejuures ei räägita selle toksiini puhul mitte reaalsest, vaid näilisest elueast, mis tuleneb selle lahjenemisest bakterite eksponentsiaalsel jagunemisel (Cataudella jt., 2012).  $\zeta$  ja Doc toksiinide puhul ei ole samuti nähtud nende tundlikkust proteaasidele (Lehnherr ja Yarmolinsky, 1995, Camacho jt., 2002).

### 1.2.3 Translatsiooni inhibeerivad TA süsteemid

Enamik seni kirjeldatud toksiine toimivad translatsiooni inhibiitoritena, kasutades seejuures mitmeid väga erinevaid mehhanisme (Guglielmini ja Van Melder, 2011). Valgusünteesi inhibeerivate toksiinide seas on kõige levinumad endoribonukleasid, mis lõikavad mRNA-d kas ribosoomist sõltuvalt või sõltumatult. Lisaks võivad toksiinid lõigata

initsiaator-tRNA-d, fosforüleerida elongatsioonifaktor Tu-d ja inhibeerida translatsiooni elongatsiooni või 70S ribosoomide assotsiatsiooni (Schuster ja Bertram, 2013).

Ribosoom-sõltuva mRNAasse aktiivsusega toksiidid seonduvad rakus ribosoomidega ja katalüüsivad transleeritavate mRNA-de lõikamist. Neist üks põhjalikumalt uuritud on *E. coli* RelE toksiid (Yamaguchi ja Inouye, 2011). RelE üleekspressioonil on translatsioonile väga tugev mõju, valgusünteesi tase langeb 20 korda juba pärast 5-minutist toksiidinduktsiooni (Hurley ja Woychik, 2009). RelE seondub ribosoomi A saiti (Pedersen jt., 2003) ja kristallstruktuuri kohaselt moodustab sidemeid peamiselt 30S subühiku 16S rRNAga (Neubauer jt., 2009). Samas on ribosoomide fraktsioneerimisel leitud, et RelE seondub vabadest subühikutest vaid 50S-iga (Hurley ja Woychik, 2009), mis viitab, et ka selle põhjalikult uuritud toksiid puhul ei mõisteta ribosoom-toksidi kompleksi moodustumist veel täielikult. Toksiini tugev efekt on tingitud sellest, et RelE lõikab mRNA-d mitmetes positsioonides, millest enamik jäävad esimese 100 koodoni sisse. Seejuures ei ole lõikekohad kindla järjestusspetsiifikaga, kuid enamasti toimub lõige pärast koodoni teist või kolmandat nukleotiidi (Hurley jt., 2011). Ka teised RelE perekonna toksiidid peatavad efektiivselt valgusünteesi, kuid nende lõikespetsiifika varieerub. Toksidi HigB lõikab A-rikkaid saite kogu mRNA ulatuses, kuid YoeB lõikab rangelt kodeerivas osas pärast teist koodonit (Hurley ja Woychik, 2009, Zhang ja Inouye, 2009).

Kromosomaalsed TA süsteemid, kus toksiidiks on ribosoom-sõltumatult mRNA-sid lagundavad valgud, on tihti seotud geenide regulatsiooniga stressitingimustes. Kuna paljud ribosoom-sõltumatud toksiidid lõikavad mRNA-d järjestusspetsiifiliselt, võivad need lagundada vaid mingi osa mRNA-dest. MazF toksiid homoloogidel võib äratundmisjärjestus olla kuni 7 nukleotiidi pikkune, mis võimaldab mRNA-sid edukalt eristada (Yamaguchi ja Inouye, 2011). Bioinformaatilisel analüüsil leiti, et soolestikupatogeen *Clostridium difficile*-l puudub MazF-i 5-nukleotiidiline sihtmärkjärjestus mitmete patogeensusega seotud valkude mRNA-des (Rothenbacher jt., 2012). *E. coli* MazF on omapärane toksiid, kuna selle äratundmisjärjestus on vaid 3-nukleotiidiline, mis viitab selle üldisele translatsiooni inhibeerivale efektile. Samas on nähtud, et mõningaid kindlaid rakusurma reguleerivaid valke sünteesitakse ka aktiivse MazF toksiid mõju all (Amitai jt., 2009). On selgunud, et nende valkude mRNA-del lõikab MazF ära peaaegu kogu startkoodonile eelneva 5'-mittetransleeritava ala, mistõttu tavalised ribosoomid ei saa nendega seonduda. Samal ajal lõikab toksiid ka olemasolevate ribosoomide 16S rRNA 3'-otsast ära 43 nukleotiidi, mis sisaldab normaalsete mRNA-de sidumiseks vajalikku anti-Shine-Dalgarno järjestust. Selliselt modifitseeritud nn. stressiribosoomid transleerivad eelistatult MazF-lõigatud mRNA-sid ja

võimaldavad stressitingimustele adapteerumisel ja rakusurma reguleerimisel oluliste valkude eelistatud sünteesi (Amitai jt., 2009, Vesper jt., 2011). Ka üks *Mycobacterium tuberculosis*-e üheksast MazF tüüpi toksiinist lõikab peale mRNA-de veel ribosoomi: selle sihtmärgiks on küpsete 50S subühikute 23S rRNA heeliks/ling 70. See rRNA piirkond on seotud muuhulgas ka tRNAde sidumisega ning ribosoomi subühikute assotsiatsiooniga ja seega ei ole MazF-lõigatud 50S subühikud funktsionaalsed (Schifano jt., 2013).

Teadagi on ka translatsiooni inhibeervaid toksiine, mis interakteeruvad ribosoomidega, kuid ei lagunda mRNA-sid. Profaag P1 Doc-toksiini puhul leiti isegi, et seda ekspresseerivates rakkudes püsib mRNA kauem stabiilsena. Doc seondub erinevalt mRNA-sidest ribosoomi 30S subühikuga ning inhibeering translatsiooni elongatsioonifaasi (Liu jt., 2008). *E. coli* RatA toksiin blokeering translatsiooni juba initsiatsioonifaasis, seondudes 50S subühikuga ja takistades 70S ribosoomide moodustumist. RatA kuulub samas ebatüüpilisse TA süsteemi, kuna sellega ühes operonis paiknev eeldatav antitoksiin YjfF ei seonu otseselt RatA-ga ega kõrvalda koekspressioonil ka translatsiooni inhibitsiooni (Zhang ja Inouye, 2011). Teisalt on uropatogeenses *E. coli* tüves CFT073 nähtud, et *ratA-yjfF*-iga praktiliselt identne *pasTI* lookus kodeering funktsionaalset TA süsteemi, kuid selle toimemehhanisme ei ole lähemalt uuritud (Norton ja Mulvey, 2012).

Peale eelmainitute on praeguseks kirjeldatud veel kaht valgusünteesi pidurdamise mehhanismi. Mitmetes patogeensetes bakterites levinud *vapBC* süsteemi toksiin VapC on tRNA-s, mis lõikab initsiaator-tRNA-d antikoodon-lingu lõpus ja takistab seega translatsiooni initsiatsiooni (Winther ja Gerdes, 2011). Ensümaatilise aktiivsuse on ka toksiinil HipA, mis fosforüleering laetud tRNA-sid ribosoomile transportiva elongatsioonifaktor EF-Tu, muutes selle inaktiivseks (Schumacher jt., 2009).

#### **1.2.4 *Pseudomonas putida* GraTA süsteem**

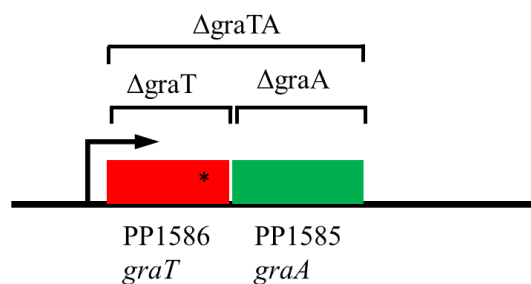
*Pseudomonas putida* genoomis sisaldub erinevate ennustuste kohaselt 8 (Pandey ja Gerdes, 2005) kuni 15 (Shao jt., 2011) TA lookust. Tulemusi kokku võttes on unikaalseid lookusi kokku 17, kuid sealhulgas on ka üksikuid geene ja ebatüüpiliselt suure vahega geenipaare (Winsor jt., 2011), mis tähendab, et tegelik funktsionaalsete TA paaride arv on ebaselge. Eksperimentaalselt ei ole seni veel ühtki *P. putida* TA süsteemi uuritud.

Üks lookus, mis kordub kõigis ennustustes, on meie laboris uuritav PP1586-PP1585, mis kodeering toksiin GraT-d ja antitoksiin GraA-d. Toksiini peamine jälgitav efekt on bakteri kasvukiiruse langus ja sellest sai lookus ka oma nime *graTA*: *growth rate affecting* ehk

kasvukiirust mõjutav TA süsteem (Tamman, 2012). Esmalt hakkas *graTA* lookus meile huvi pakkuma kahekomponentset ColRS signaalirada uurides. *ColR*-defektne *P. putida* tüvi ei talu glükoosi tardsöötmel kasvades toidunappust ning osa populatsioonist lüüsub (Putrinš jt., 2008). Lüüsisiga seotud geenide leidmiseks tehti transposoonmutagenees, kus otsiti mittelüüsuvaid *colR*-topeltmutante. Selgus, et teiste seas kõrvaldas lüüsi ka PP1585 geeni katkestus, mis kodeerib ennustuse kohaselt antitoksiini geeni ja on ühes operonis toksiini kodeeriva PP1586-ga (Putrinš jt., 2011). Antitoksiini katkestusmutant on huvipakkuv, kuna reeglina ei ole antitoksiine võimalik deleteerida (Shah jt., 2006, Budde jt., 2007). Veelgi intrigeerivam on fakt, et antitoksiini katkestus ei paistnud olevat rakkudele kuigi toksiline, pigem vastupidi, sest *colR*-mutantses tüves kõrvaldas see mitmed tüvele omased defektid, lisaks lüüsile ka vähenenud fenooli- ja EDTA-taluvuse (Tamman, 2012). Seetõttu otsustasime *graTA* lookust lähemalt kirjeldada.

Valgujärjestuste analüüs näitas, et GraT ja GraA on seni uuritud valkudest kõige sarnasemad *Vibrio cholerae* HigB ja HigA-ga, kusjuures toksiinid on 34% ja antitoksiinid 37% identsed (Tamman, 2012). See viitas, et *graTA* lookus võiks kodeerida HigBA perekonna TA süsteemi, kus toksiin seondub ribosoomidega ja inhibeerib mRNA-sid lõigates translatsiooni (Christensen-Dalsgaard ja Gerdes, 2006, Hurley ja Woychik, 2009).

Selleks, et teha kindlaks, kas GraT ja GraA moodustavad funktsionaalse TA süsteemi, konstrueeriti deletsioontüved  $\Delta graA$ ,  $\Delta graT$  ja  $\Delta graTA$ , kus *P. putida* algtüvest on deleteeritud vastavalt antitoksiin, toksiin ja terve TA operon, nagu on kujutatud joonisel 3. Juhusliku PCR-i vea tõttu tekkis ühes antitoksiini deletsioontüves punktmutatsioon toksiini geenis, kus 80. positsiooni glutamiinhape asendus glütsiiniga (tüvi  $\Delta graA_{Te80g}$ ) (Tamman, 2012).



**Joonis 3.** *GraTA* operoni skeem. Punasega on märgitud toksiini geen *graT* ja rohelisega antitoksiini geen *graA*. Klambritega on näidatud geenid, mis on vastavates tüvedes deleteeritud. Tärn toksiini geenil tähistab ligikaudselt kohta, kus tekkis punktmutatsioon E80G. Noolega on näidatud transkriptsiooni alguskoht.

Deletsioontüvedega tehtud katsed näitasid, et *graTA* kodeerib funktsionaalset TA süsteemi, kuid toksiini mõju on suhteliselt nõrk ja võimaldab antitoksiini puudumisel rakkude normaalset kasvu. Sellegipoolest on toksiini efekt märgatav, sest  $\Delta$ graA tüve kasvukiirus on algtüvest väiksem nii tahkel kui vedelas söötmes. Kui algtüve generatsiooniaeg LB vedelsöötmes 30 °C juures on 64,7 minutit, siis  $\Delta$ graA tüvel on see 81,9 minutit (Tamman, 2012). Lisaks süveneb tüvedevaheline kasvukiiruste erinevus temperatuuri langedes. 30 °C juures on  $\Delta$ graA kolooniad LB agarsöötmele algtüvest väiksemad, kuid 20 °C juures ei suuda  $\Delta$ graA ka kolme päeva jooksul kolooniaid moodustada (Tamman, Hõrak, avaldamata andmed). Terve *graTA* lookuse puudumine kasvukiirust ei mõjuta, mis näitab, et  $\Delta$ graA kasvupeetus tuleneb GraT mõjust. Toksiini efekti kinnitab veel fakt, et mutantse toksiiniga  $\Delta$ graA<sub>Te80g</sub> kasv ei erine samuti algsest tüvest. Täiendavaks kontrolliks tehti ka GraT üleekspressioonikatse, mis näitas, et ilma antitoksiinita tüved ei suuda toksiini induktsiooni tingimustes praktiliselt üldse kasvada ja kinnitas, et GraT on tõepoolest funktsionaalne toksiin (Tamman, 2012).

Süsteemi edasise iseloomustamise käigus mõõdeti ka *graTA* operoni promootori aktiivsust erinevates tüvedes, et selgitada välja, kas antitoksiin toimib oma operoni autorepressorina. Leiti, et antitoksiinita  $\Delta$ graA ja  $\Delta$ graTA tüvedes on promootori aktiivsus ~5 korda suurem kui algse tüves, mis näitab, et antitoksiin represseerib operoni transkriptsiooni.  $\Delta$ graT tüves seevastu on promootor veel tugevamini represseeritud kui algse tüves, mis viitab, et operoni promootori repressiooniks ei ole vaja toksiin-antitoksiin kompleksi moodustumist (Tamman, 2012).

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Töö eesmärgid

*Pseudomonas putida graTA* lookus kodeerib funktsionaalset toksiin-antitoksiin süsteemi, mis paigutub järjestuste sarnasuse põhjal HigBA perekonda. Samas on toksiini efekt võrreldes senikirjeldatud prokarüootsete TA süsteemide toksiinidega pigem mõõdukas ning rakud suudavad ellu jääda ka ilma antitoksiinita. Toksiin GraT toimel väheneb bakteri kasvukiirus ja antitoksiin GraA kõrvaldab selle efekti (Tamman, 2012). GraT on ebaoharilik toksiin ka seetõttu, et selle toimel kaovad *colR*-mutantse *P. putida* erinevad, peamiselt membraani homöostaasiga seotud defektid (Putrinš jt., 2011). GraTA süsteemi reguleerib transkriptsiooni tasemel GraA, mis toimib autorepressorina ning on viiteid, et toksiin ei pruugi repressioonis osaleda (Tamman, 2012). Need tulemused näitavad, et GraTA näol ei ole ilmselt tegemist tüüpilise HigBA lookusega ja seetõttu otsustasime GraTA süsteemi toimemehhanisme põhjalikumalt analüüsida. Sellega seoses on käesoleva töö eesmärkideks:

- 1) kontrollida, kas GraT ja GraA moodustavad valkkompleksi nagu on omane II tüüpi TA süsteemidele;
- 2) kirjeldada nii antitoksiini kui toksiin-antitoksiin kompleksi seondumist *graTA* operoni promootorile, et selgitada lookuse transkriptsiooni regulatsiooni;
- 3) analüüsida antitoksiini GraA stabiilsust, et selgitada süsteemi aktivatsiooni mehhanismi
- 4) ning analüüsida toksiini mõju raku ribosoomide profiilile, et selgitada, kas GraT võiks kasvukiirust mõjutada translatsioonisüsteemi kaudu, nagu on kirjeldatud HigB puhul.



## 2.2 Materjal ja metoodika

### 2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja söötmed

Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1. Söötmena kasutati LB vedelsöödet (1% trüpton, 0,5% pärmiekstrakt, 0,5% NaCl). Plasmidi kandvate rakkude selektsiooniks kasutati ampitsilliini (Amp) lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml. *E. coli* rakke kasvatati 37 °C ja *P. putida* rakke 30 °C juures, kui ei ole öeldud teisiti.

**Tabel 1** Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Iseloomustus	Viide
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169(φ80 lacZΔM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Miller, 1992)
BL21(DE3)	<i>hsd gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5</i> <i>lacUV5-T7geen 1)</i>	(Studier ja Moffatt, 1986)
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Algne tüvi, isogeenne täielikult sekveneeritud <i>P. putida</i> KT2440 tüvega	(Bayley jt., 1977)
ΔgraA	PaW85 Δ <i>graA</i>	(Tamman, 2012)
ΔgraT	PaW85 Δ <i>graT</i>	(Tamman, 2012)
ΔgraA <sub>Te80g</sub>	PaW85 Δ <i>graA graT</i> <sub>E80G</sub>	(Tamman, 2012)
<b>Plasmiid</b>		
pET11c-hisA	N-terminaalse His <sub>6</sub> -märkega GraA üleekspressiooniplasmiid	Rita Hõrak
pET11c-Ahis	C-terminaalse His <sub>6</sub> -märkega GraA üleekspressiooniplasmiid	Rita Hõrak
pET11c-hisT	N-terminaalse His <sub>6</sub> -märkega GraT üleekspressiooniplasmiid	käesolev töö
pET11c-hisT+A	N-terminaalse His <sub>6</sub> -märkega GraT ja märketa GraA üleekspressiooniplasmiid	käesolev töö
1586pr/9TTBlacZ	<i>graTA</i> promootorala matriits <i>gel mobility</i> <i>shift</i> ja DNAas I jalajälje reaktsioonide ettevalmistamisel	(Tamman, 2012)

### 2.2.2 Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i reaktsioonidel kasutati matriitsina puhastatud plasmiidset DNA-d või bakterirakke. Reaktsioonimaht oli 20 µl, segu sisaldas peale matriitsi 75 mM Tris pH 8,8;

20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween 20; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 10 pmol kumbagi praimerit ja 1 ühiku Taq või Pfu DNA polümeraasi. Reaktsioon koosnes 25 tsüklist, mille jooksul toimus: DNA denaturatsioon (45 sek 96 °C), praimerite seondumine matriitsile (45 sek 55 °C) ja DNA süntees 72 °C juures. Sünteesiaeg sõltus amplifitseeritava fragmendi pikkusest ja kasutatavast polümeraasist, arvestusega et Taq polümeriseerib ligikaudu 1000 ja Pfu 500 nukleotiidi minutis. Praimeritena kasutatud oligonukleotiidid on esitatud tabelis 2.

**Tabel 2** Töös kasutatud oligonukleotiidid

Nimetus	Järjestus	Kasutamine
T-NHis2	5'-AAT GTC GAC TAA ACG TTA AGC ATT CAG CTC CAT ATG CAT CAC CAC CAC CAT CAC ATT CGA AGC TTT AGC TGT-3'	N-terminaalse His <sub>6</sub> - märkega GraT ekspressioonvariantide konstrueerimine
1585Bam	5'-ATG GAT CCG TTT TTC GAT GTC AGT C-3'	pET11c-hisT+A konstrueerimine
1586Bam	5'-CGG GAT CCG TTC TTG AGC ATG ATG C-3'	pET11c-hisT konstrueerimine
Fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	<i>gel mobility shift</i> ja
1585Sac	5'-ACC GAG CTC AGC AGG ATG AGA ACG GTG-3'	DNaas I jalajälje proovide valmistamine
graTees	5'-ATG TGA CCG GAG CTT GCG A-3'	DNaas I jalajälje proovide valmistamine

### 2.2.3 Kloneerimine

His<sub>6</sub>-GraT ja His<sub>6</sub>-GraT+GraA ekspressiooniplasmiidide konstrueerimiseks amplifitseeriti vastavad geenid *P. putida* metsiktüve rakke matriitsina kasutades. Ühe praimerina kasutati T-NHis2, mis lisab GraT N-terminusse His<sub>6</sub>-peptiidi ning teise praimerina kas 1586Bam või 1585Bam, mille abil tekitati vastavalt kas His<sub>6</sub>-GraT või His<sub>6</sub>-GraT+GraA fragmendid. PCR-is kasutati Pfu DNA polümeraasi. Saadud PCR fragmente töödeldi restriктаasidega NdeI ja BamHI ning need ligeeriti T4 DNA ligaasi kasutades samade ensüümidega avatud ja aluselise fosfataasiga töödeldud pET11c ekspressioonivektoris. Kloneerimisel kasutati *Thermo Scientific*-u ensüüme tootja ette nähtud reaktsioonitingimustel, ainsa erinevusega, et restriктаase kasutati soovitatust kaks korda väiksemas koguses.

Plasmiidid eraldati *FavorPrep Plasmid DNA Exctraction Mini Kit* komplektiga (*Favorgen*) vastavalt tootja protokollile.

#### 2.2.4 Bakterite elektroporatsioon

Elektroporatsiooniks kompetentsete *E. coli* rakkude saamiseks kasvatati rakke üleöö 5 ml LB vedelsöötmes. Üleöökultuurist inokuleeriti 150 µl värskesse 5 ml LB vedelsöötmesse ning rakke kasvatati 2 tundi ja 20 minutit ( $OD_{580} = 0,2-0,3$ ). Seejärel tõsteti bakterikultuurid jääle ning tsentrifuugiti rakud kokku (45 sek, 16100 x g, 4 °C). Rakke pesti kaks korda 1 ml destilleeritud veega ning üks kord 200 µl 10% glütserooliga. Seejärel suspendeeriti rakud 80 µl 10% glütseroolis ning üheks elektroporatsiooniks kasutati 45 µl suspensiooni. Rakkudele lisati 0,1-0,5 µg vees lahustatud DNA-d ning segu tõsteti elektroporatsiooniküveti. Elektroporatsiooniks kasutati *Bio-Rad*-i elektroporaatorit pingel 2500 V. Rakud pesti küvetist 1 ml LB söötmega välja ning kasvatati 45-60 minutit 37 °C juures. Seejärel plaaditi rakud 100 µg/ml ampitsilliini sisaldavatele selektiivtassidele.

#### 2.2.5 SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees

Kui ei ole teisiti öeldud, valmistati elektroforeesiproovid mahus 15 µl ja selleks segati kokku 7,5 µl uuritavat valgulahust ja 7,5 µl 2 x Laemmli puhvrit (0,125 M Tris pH 6,8; 20% glütserool; 2% SDS; 2% β-merkaptotetanool; 0,001% broomfenoolsinine). Vajadusel viidi uuritava valgulahuse maht puhvri lisamisega 7,5 µl-ni. Proove kuumutati enne geelile kandmist 10 minutit 96 °C juures.

Valkude lahutamiseks kasutati 10% tritsiin-SDS-polüakrüülamiidgeele (Schägger, 2006). Elektroforees toimus konstantsel pingel ~100 V, kasutades *Bio-Rad*-i *Mini PROTEAN Tetra* foreesisüsteemi. Geele värviti Coomassie G-250 värvilahusega (0,2% Coomassie Brilliant Blue G-250; 50% etanool; 10% äädikhape).

#### 2.2.6 Valkude ekspressioon ja puhastamine

Valkude ekspresseerimiseks kasutati *E. coli* BL21(DE3) tüve, kuhu viidi ekspresseeritava valgu geeni kandev pET11c plasmiid. Et kontrollida, kas valk ekspresseerub ning kas see on lahustuv fraktsioonis, kasvatati plasmidi kandvaid baktereid 5 ml LB Amp vedelsöötmes kuni  $OD_{580} \approx 0,5$ . Seejärel indutseeriti valgusüntees 0,5 mM IPTG lisamisega ning rakke kasvatati kolm tundi. Totaallüsaadi saamiseks eraldati 1 ml kultuuri ning tsentrifuugiti rakud kokku (1 min, 12100 x g). Rakumass suspendeeriti 75 µl 2 x Laemmli puhvris ning sellest kanti 2 µl SDS-PA geelile. Lahustuvate ja sadenenud valkude fraktsioonide kogumiseks tsentrifuugiti ülejäänud rakukultuurist bakterimass kokku (1 min,

12100 x g) ning suspendeeriti 400 µl 1 x M9 puhvril (42 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 19 mM NH<sub>4</sub>Cl; 9 mM NaCl). Rakud purustati ultrasonikaatoriga kahe 10-sekundilise tsükliga. Fraktsioonid eraldati tsentrifuugimisel (10 min, 16100 x g, 4 °C). Lahustuvast fraktsioonist valmistati 2 x Laemmli puhvriga SDS-geeli proovid, sademefraktsioon suspendeeriti 30 µl samas puhvril ning mõlemaid kuumutati 10 minutit 96 °C juures. Proove analüüsiti SDS-PA geelis.

Valgu puhastamiseks inokuleeriti 5 ml üleöö 30 °C juures LB Amp söötmes kasvanud bakterikultuuri 200 ml värskesse LB Amp söötmesse ning rakke kasvatati 30 °C juures kuni OD<sub>580</sub> oli ligikaudu 0,5. Seejärel indutseeriti valgusüntees 0,5 mM IPTG lisamisega ja kasvatati veel neli tundi. Rakud koguti kokku tsentrifuugimisel (5 min, 8000 x g, 4 °C) ja pesti 15 ml 50 mM fosfaatpuhvriga (pH 7,6), milles oli 1 M NaCl. Pestud rakud tsentrifuugiti samadel tingimustel kokku, suspendeeriti 3 ml samas puhvril ning külmutati -20 °C juures. Järgnevalt rakud sulatati ning purustati ultrasonikaatoriga kuue 5-sekundilise tsükliga. Lahustuv fraktsioon eraldati tsentrifuugimisel (20 min, 16000 x g, 4 °C). Valgulahus kanti ÄKTAprime plus kromatograafiamasinal HisTrap HP 1 ml kolonnile (*GE Healthcare Life Sciences*). Kolonni pesti A puhvriga (50 mM fosfaatpuhver pH 7,6; 0,5 M NaCl; 50 mM imidasool; 10% glütserool) ning valk elueeriti B puhvriga (50 mM fosfaatpuhver pH 7,6; 0,5 M NaCl; 600 mM imidasool; 10% glütserool). Elueeritud fraktsioone analüüsiti *PrimeView* programmiga ning selle põhjal valiti välja fraktsioonid, milles valgu olemasolu kontrolliti SDS-PA geelil. Enim valku sisaldanud fraktsioonid võeti kokku ning valk dialüüsiti kolmes 24-tunnilises etapis säilituspuhvrisse (esimene puhver 10 mM Tris pH 7,5; 300 mM KCl; 20% glütserool, teine puhver 10 mM Tris pH 7,5; 250 mM KCl; 35% glütserool, säilituspuhver 10 mM Tris pH 7,5; 200 mM KCl; 50% glütserool). Dialüüsiks kasutati Spectra/Por dialüüsikotti läbilaskepiiriga 3500 Da (*Spectrum Medical Industries*). Puhastatud valkude kontsentratsioonid määrati *Bio-Rad*-i *Quick Start* Bradfordini reagentiga vastavalt tootja protokollile.

### 2.2.7 His<sub>6</sub>-märkega valkude detektsioon HisProbe-HRP reagentiga

His<sub>6</sub>-märkega valkude detekteerimiseks lahutati valgud SDS-PA geelis ning kanti nitrotselluloosmembraanile (*Amersham Hybond ECL*, *GE Healthcare*) ülekandepuhvril (38 mM glütsiin; 48 mM Tris; 0,015% SDS; 20% metanool), kasutades *Bio-Rad*-i *Trans-Blot SD* ülekandesüsteemi konstantsel pingel 15 V 30 minuti jooksul.

Ebaspetsiifilise seondumise blokeerimiseks inkubeeriti membraani tund aega 10 ml BB puhvril (25 mM Tris pH 7,2; 0,15 M NaCl; 25 mg/ml BSA; 0,05% Tween 20).

Membraani pesti kaks korda 10 minutit TBS-T puhvriga (25 mM Tris pH 7,2; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20) ning seejärel inkubeeriti tund aega 10 ml BB puhvril, millesse oli lisatud 1:200 000 HisProbe-HRP reagenti (*Thermo Scientific*). Pärast reagentiga inkubeerimist pesti membraani neli korda 10 minutit 15 ml TBS-T puhvriga. Valgud visualiseeriti *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* komplekti (*GE Healthcare*) kasutades, luminescents eksponeeriti Fujifilm Super RX filmile.

### 2.2.8 Antitoksiini stabiilsuse analüüs

Antitoksiini stabiilsuse analüüsiks valmistati *P. putida* PaW85 üleökultuurist lüsaat. Selleks võeti 20 ml bakterikultuuri, millest koguti rakud tsentrifuugimisega (1 min, 12100 x g). Rakke pesti 3 ml PBS puhvriga (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), tsentrifuugiti uuesti ning suspendeeriti PBS puhvril lõppmahuga 500 µl. Rakud purustati ultrasonikaatoriga kuue 5-sekundilise tsükliga. Saadud rakulüsaati tsentrifuugiti (10 min, 16100 x g, 4 °C) ja sademe pealt eraldati supernatant. Selles määrati valgukontsentratsioon *Bio-Rad*-i *Quick Start* Bradfordin reagentiga vastavalt tootja protokollile.

Stabiilsuskatse toimus 100 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas PBS puhvrit, 0,35 µg (30 pmol) His<sub>6</sub>-GraA või 0,15 µg (13 pmol) GraA-His<sub>6</sub> valku ning rakulüsaati nii, et kokku oleks ~500 µg totaalkalku. Osades katsetes lisati 4 mM lõppkontsentratsiooniga ATP-d ning rakulüsaadita katses ei lisatud lüsaati.

Reaktsioonisegusid inkubeeriti 30 °C termokapis ning kindlaksmääratud aegadel eraldati sealt 10 µl proovid. Neis peatati reaktsioon 10 µl 2 x Laemmli puhvri lisamisega ning 10 minuti jooksul 96 °C juures kuumutamiseega. Proovid lahutati SDS-PA geelil ning His-märkega valke detekteeriti HisProbe-HRP reagentiga.

### 2.2.9 Radioaktiivmärgisega DNA proovi valmistamine

Praimerite radioaktiivselt märkimiseks kineeriti nende 5'-ots  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP-ga. Selleks kasutati *Thermo Scientific*-u polinukleotiidi kinaasi (PNK). Reaktsioonisegu mahus 20 µl sisaldas 2 µl PNK puhvrit A (*Thermo Scientific*), 15 pmol kineeritavat praimerit, 5 ühikut PNK-d ning 3 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP-d. Segu inkubeeriti 37 °C juures 1,5 tundi. Seejärel lisati praimeri sadestamiseks 30 µl vett, 200 µl 96% etanooli ja 5 µl 5 M NaCl ning hoiti -20 °C juures üleöö. Sadenenud praimer kuivatati 37 °C termostaadis ning lahustati 9 µl vees.

Radioaktiivsete DNA fragmentide saamiseks tehti PCR reaktsioon, kus kasutati üht radioaktiivselt märgistatud ja teist märkimata praimerit (tabel 2). PCR-i produkt puhastati 5%

polüakrüülamiidgeelis, foreesipuhvriks kasutati TBE puhvrit (45 mM Tris pH 7,5; 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,9 mM EDTA), kuhu oli lisatud 40 µg etiidiumbromiidi. Forees toimus pingel 13 V/cm. Märgistatud DNA-d sisaldav geelitükk lõigati UV valguses välja, tõsteti 350 µl puhvrissi (0,5 M ammooniumatsetaat; 10 mM magneesiumatsetaat; 1 mM EDTA; 0,1% SDS) ning DNA elueeriti 37 °C juures loksutil üleöö. Geelitükkidelt eraldati 200 µl DNA lahust uude tuubi ning suurema saagise jaoks loputati geelitükke täiendavalt 100 µl elueerimispuhvriga, mis lisati eelnevalt eraldatud DNA lahusele. Saadud lahusest sadestati DNA etanooli ja NaCl lisamisega, proove hoiti 30 minutit -20 °C juures. Radioaktiivne PCR-i produkt kuivatati 37 °C termostaadis ja seejärel mõõdeti proovi radioaktiivsus *PerkinElmer Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyzer*-iga. DNA lahustati vees nii, et proovi radioaktiivsus oleks DNAas I jalajälje reaktsiooniks 10 000 ja *gel mobility shift* analüüsiks 1000 CPM (*counts per minute*) ühes mikrolitris.

#### **2.2.10 Gel mobility shift analüüs**

Puhastatud GraA-His<sub>6</sub> valgu ja His<sub>6</sub>-GraT+GraA valkkompleksi seondumist *graTA* operoni promootorile analüüsiti *gel mobility shift* meetodil, mis põhineb DNA ja DNA-valk kompleksi erineval liikuvusel elektroforeesil. DNA ja valgu seondamiseks segati kokku 25 µl reaktsioonisegud, mis sisaldasid 25 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 5% glütserool; 2,5 µg BSA-d; 1 µg lõhe spermi DNA-d, 2000 CPM radioaktiivset DNA-d ning erinevas koguses puhastatud valku. Enne reaktsioonisegusse lisamist võrdsustati valguproovide maht valgu säilituspuhvri lisamisega. Reaktsioonisegused inkubeeriti 25 minutit toatemperatuuril ja kanti seejärel 5% polüakrüülamiidgeelile. Foreesipuhvriks kasutati TBE puhvrit (45 mM Tris pH 7,5; 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,9 mM EDTA). Elektroforees toimus temperatuuril 4 °C, pingel 10 V/cm. Geel kuivatati vaakumkuivatis ning eksponeeriti *Phosphoimageri* ekraanile. Ekraanilt visualiseeriti tulemused *Phosphoimager Typhoon Trio* seadme ja ImageQuant TL v2005 tarkvaraga (*GE Healthcare*).

#### **2.2.11 DNAas I jalajälje reaktsioon**

DNA-valk seondumise täpsemaks kaardistamiseks tehti DNAas I jalajälje katse, kus DNA-ga seondunud valk takistab seondumisalal DNAas I lõikust. Esmalt valmistati ette DNA-valk seondumisreaktsioonid mahus 50 µl. Üks reaktsioon sisaldas puhvrit (25 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 5% glütserool); 1 µg lõhe spermi DNA-d; 5 µg BSA-d; 30000 CPM radioaktiivset DNA-d ning erinevas koguses uuritavat valku. Valguproovide maht viidi enne reaktsioonisegusse lisamist säilituspuhvri lisamisega võrdseks. Seondumine toimus toatemperatuuril 30 minuti jooksul.

Järgnevalt tehti reaktsioonisegudele DNAas I töötlus, milleks lisati igale reaktsioonile 0,06 ühikut DNAas I (*Thermo scientific*). DNAas I töötlus toimus täpselt 3 minutit, misjärel reaktsioon peatati 50 µl DNAas I stopplahuse (20 mM Tris pH 8,0; 20 mM EDTA; 0,8% SDS; 0,1 µg/µl lõhe spermi DNA) lisamisega. DNA puhastati valkudest fenool-kloroform töötlusega ning sadestati etanooli ja NaCl lisamisega 20 minuti jooksul temperatuuril -20 °C. Sademed kuivatati ning lahustati 3,5 µl vees ja lisati 3,5 µl sekvenaasi stopplahust (95% formamiid; 20 mM EDTA; 0,05% broomfenoolsinine). DNA sekventsireaktsioonideks kasutati *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit* komplekti (*USB Corporation*) vastavalt tootja ette nähtud protokollile.

DNAas I jalajälje ja sekventsireaktsiooni proovid lahutati 6,5% polüakrüülamiidgeelis, mis sisaldas 8 M ureat. Foresipuhvriks kasutati TBE puhvrit pH-ga 8,3. Fores toimus pingel 2500-2800 V. Geelid kuivatati vaakumkuivatis ning eksponeeriti *Phosphorimageri* ekraanile. Ekraanilt visualiseeriti tulemused *Phosphorimager Typhoon Trio* seadme ja ImageQuant TL v2005 tarkvaraga (*GE Healthcare*).

#### **2.2.12 Ribosomaalsete partiklite eraldamine sahharoosgradiendis**

Ribosoomide profiili analüüsi jaoks ribosoomide eraldamiseks inokuleeriti üleöö LB vedelsöötmes kasvanud baktereid 100 ml värskesse LB söötmesse nii, et algne OD<sub>580</sub> oleks ligikaudu 0,05. Üleöökultuure kasvatati samadel temperatuuridel, kuhu neid järgnevalt lahjendati. Baktereid kasvatati temperatuuridel 30 °C, 25 °C ja 20 °C loksutil, kuni OD<sub>580</sub> ≈ 1. Seejärel koguti rakud tsentrifuugides (5 min, 7500 x g, 4 °C) ja edasi töötati jääl. Rakud suspendeeriti 1 ml LLP puhvris (10 mM Tris pH 8,0; 60 mM KCl; 60 mM NH<sub>4</sub>Cl; 12 mM MgOAc; 6 mM β-merkaptotanoool), suspensioonile lisati lüotsüümi lõppkontsentratsiooniga 1 mg/ml ja DNAasi lõppkontsentratsiooniga 20 U/ml. Rakud lüüsi *Precellys 24* homogenisaatoris (*Bertin Technologies*) kolme 60-sekundilise tsükliga ja lahustumatu fraktsioon eraldati tsentrifuugimisel (15 min, 16000 x g, 4 °C). Saadud lüsaadis mõõdeti RNA kontsentratsioon *NanoDrop* spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 nm. Ribosoomid lahutati 15-40% lineaarses sahharoosgradiendis LLP puhvris. Gradiendile kanti 30 A<sub>260</sub> ühikut rakulüsaati ja tsentrifuugiti üleöö *Beckman Coulter* SW 32 Ti või SW 28 rootoriga ( $\omega^2t = 2,7 \times 10^{11}$ , 4 °C). Ribosoomiprofiilid saadi isekirjutajaga ühendatud läbivooluspektrofotomeetrilt lainepikkusel 254 nm.

*In vitro* translatsioonikatseks eraldati ribosoomid sarnaselt. Rakke kasvatati 1 liitris LB söötmes temperatuuril 25 °C ning kogutud rakumass suspendeeriti 4 ml LLP puhvris. Sahharoosgradiendid formeeriti 22% sahharoosilahusest LLP puhvris külmutamise ja

sulatamise teel. Ühele gradiendile kanti 100 A<sub>260</sub> ühikut rakulüsaati, mis lahutati tsentrifuugides ( $\omega^2t = 3,1 \times 10^{11}$ , 4 °C). Gradientidelt koguti eraldi 70S, 50S ja 30S ribosoomipartikleid sisaldavad fraktsioonid, mida lahjendati LLP puhvriga ning ribosoomid sadestati *Beckman Coulter* Ti 45 rootoris tsentrifuugides ( $\omega^2t = 1 \times 10^{12}$ , 4 °C). Sadenenud 50S ja 30S subühikud lahustati LLP puhvril, külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures. Sadenenud 70S ribosoomid lahustati LLP puhvril, mis sisaldas 1 mM MgOAc, et subühikud dissotsieerida. Dissotsieeritud subühikud lahutati 22% sahharoosilahusest 1 mM MgOAc-ga LLP puhvril külmutamise ja sulatamise teel formeeritud gradientidel tsentrifuugides (SW 28 või SW 32 Ti rootor,  $\omega^2t = 3,5 \times 10^{11}$ , 4 °C). 50S ja 30S subühikuid sisaldavad gradiendi fraktsioonid koguti eraldi. Mg<sup>2+</sup> kontsentratsioon tõsteti MgOAc lisamisega 20 mM-ni ning subühikud sadestati tsentrifuugides (Ti 45 rootor,  $\omega^2t = 1 \times 10^{12}$ , 4 °C). Sadenenud subühikud lahustati LLP puhvril, külmutati vedelas lämmastikus ning hoiustati -80 °C juures.

### 2.2.13 *In vitro* translatsioonikatse

Puhastatud ribosomaalsete subühikute translatsioonilise aktiivsuse määramiseks tehti *in vitro* polü(U) translatsioonikatse. Reaktsioonisegu sisaldas kokku 330 µl mahus 5 või 10 pmol ribosoomi subühikuid; LLP puhvrit; 0,9 µg/µl polü(U); tRNA-de segu, mille hulgas oli 0,615 µM tRNA-Phe; 0,5 µCi (4 µM) <sup>14</sup>C-Phe; 0,1 mM Phe; 2 mM ATP; 1 mM GTP; 8 mM fosfoenoolpüruvaati; 2,7 ühikut püruvaadi kinaasi (*Sigma*); 10,6 µl fenüülalanüül-tRNA süntetaasi; 13,2 µl EF-G-d ja 19,8 µl EF-Tu-d. Katses kasutati puhastatud *E. coli* translatsioonifaktoreid, mille kogus oli eelnevalt optimeeritud (Aivar Liiv). Reaktsioonisegu valmistamisel segati eraldi kokku ribosoomi subühikud koos polü(U)-ga LLP puhvril (segu A) ning kõik ülejäänud komponendid LLP puhvril (segu B). Kumbagi segu inkubeeriti 37 °C juures 15 minutit, et segus A seonduksid ribosoomi subühikud polü(U) matriitsiga ning segus B toimuks tRNA-Phe laadimine Phe-ga. Translatsioon käivitati segude A ja B kokkusegamisega, reaktsioon toimus temperatuuril 37 °C. Kindlaksmääratud ajapunktidel (1; 2,5; 5; 10; 30 minutit) võeti reaktsioonisegust 50 µl proovid, millele lisati translatsiooni peatamiseks ja sünteesitud polüpeptiidi sadestamiseks 2 ml 5% TCA-d ja kuumutati 20 minutit 95 °C juures. Segudest filtreeriti sünteesitud polüpeptiid *Whatman GF/C* klaaskiudfiltrile, kuhu lisati 6 ml *PerkinElmer Optiphase HiSafe 3* stsintsillaatorit ning proovide radioaktiivsus mõõdeti *PerkinElmer Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyzer*-iga.



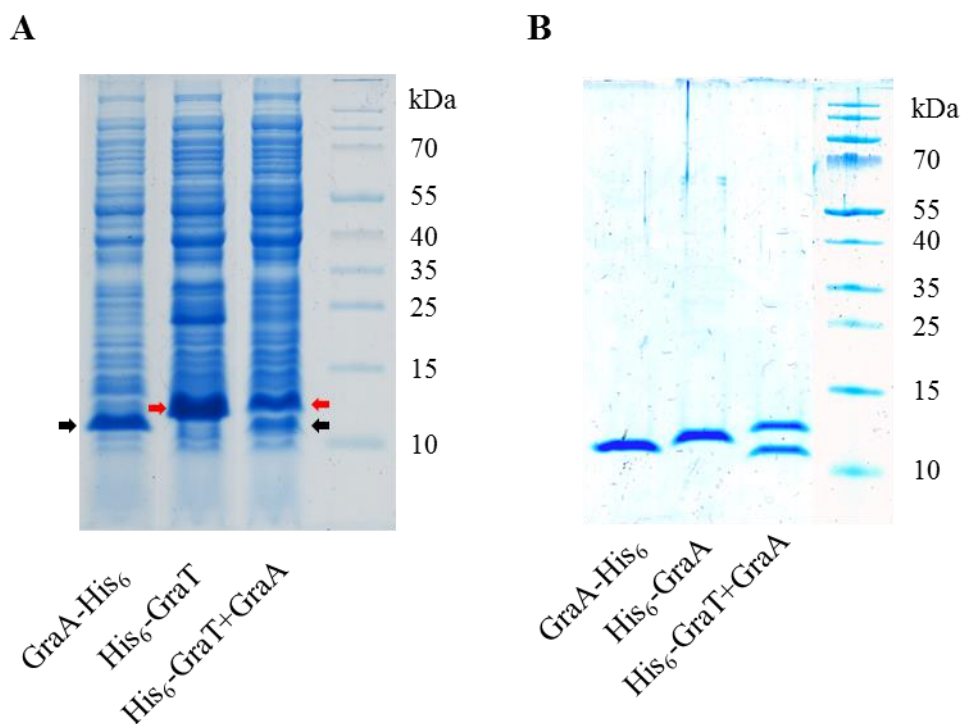
## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 GraT ja GraA moodustavad kompleksi

Selleks, et iseloomustada GraTA süsteemi *in vitro* katsetega, ekspresseerisin esmalt süsteemi kuuluvaid valke (tabel 3) *E. coli* BL21(DE3) tüves ning puhastasin neid His<sub>6</sub>-märgise abil. Antitoksiini stabiilsuse ja *graTA* operoni promootori regulatsiooni selgitamiseks vajalik C-terminaalse His-märkega GraA (GraA-His<sub>6</sub>) oli meie laboris juba varasemalt puhastatud (Kadi Ainsaar). Kuna see valk puhastus kergesti isegi proteaasi inhibiitoreid kasutamata ja paistis esialgsete katsete käigus antitoksiini kohta ootamatult stabiilne olevat, puhastasin C-terminaalse His-märke võimaliku mõju kõrvaldamiseks ka N-terminaalse märkega GraA (His<sub>6</sub>-GraA). GraA ja GraT omavahelise seondumise ja ka promootori regulatsiooni uurimiseks puhastasin koos ekspresseeritud N-terminaalse His-märkega GraT ning lisamärgiseta GraA (His<sub>6</sub>-GraT+GraA). Algselt oli plaanis puhastada ka His-märkega GraT ning valk ka ekspresseerus (joonis 4 A), kuid ei olnud puhastamiseks sobivalt rakulüsaadi lahustuvas fraktsioonis.

**Tabel 3** GraTA süsteemi valkude ja nende His<sub>6</sub>-märgisega variantide parameetrid

Valk või kompleks	Arvutuslik molekulmass, kDa	Puhastatud valgu kontsentratsioon
His <sub>6</sub> -GraT+GraA	22,2	0,51 mg/ml
GraA-His <sub>6</sub>	11,7	0,48 mg/ml
His <sub>6</sub> -GraA	11,7	2,22 mg/ml
His <sub>6</sub> -GraT	11,3	
GraA	10,9	
GraT	10,4	



**Joonis 4.** GraTA süsteemi valkude üleekspressioon ja puhastamine. A. GraA-His<sub>6</sub>, His<sub>6</sub>-GraA ja His<sub>6</sub>-GraT+GraA valke ekspresseerinud *E. coli* BL21(DE3) rakkude totaallüsaadid lahutatuna SDS-PA geelis. Punaste nooltega on tähistatud His<sub>6</sub>-GraT valk, mustadega GraA variandid. B. Puhastatud valgud lahutatuna SDS-PA geelis. Üksikuid valke on geelil 0,5 µg, kompleksi kokku 1 µg.

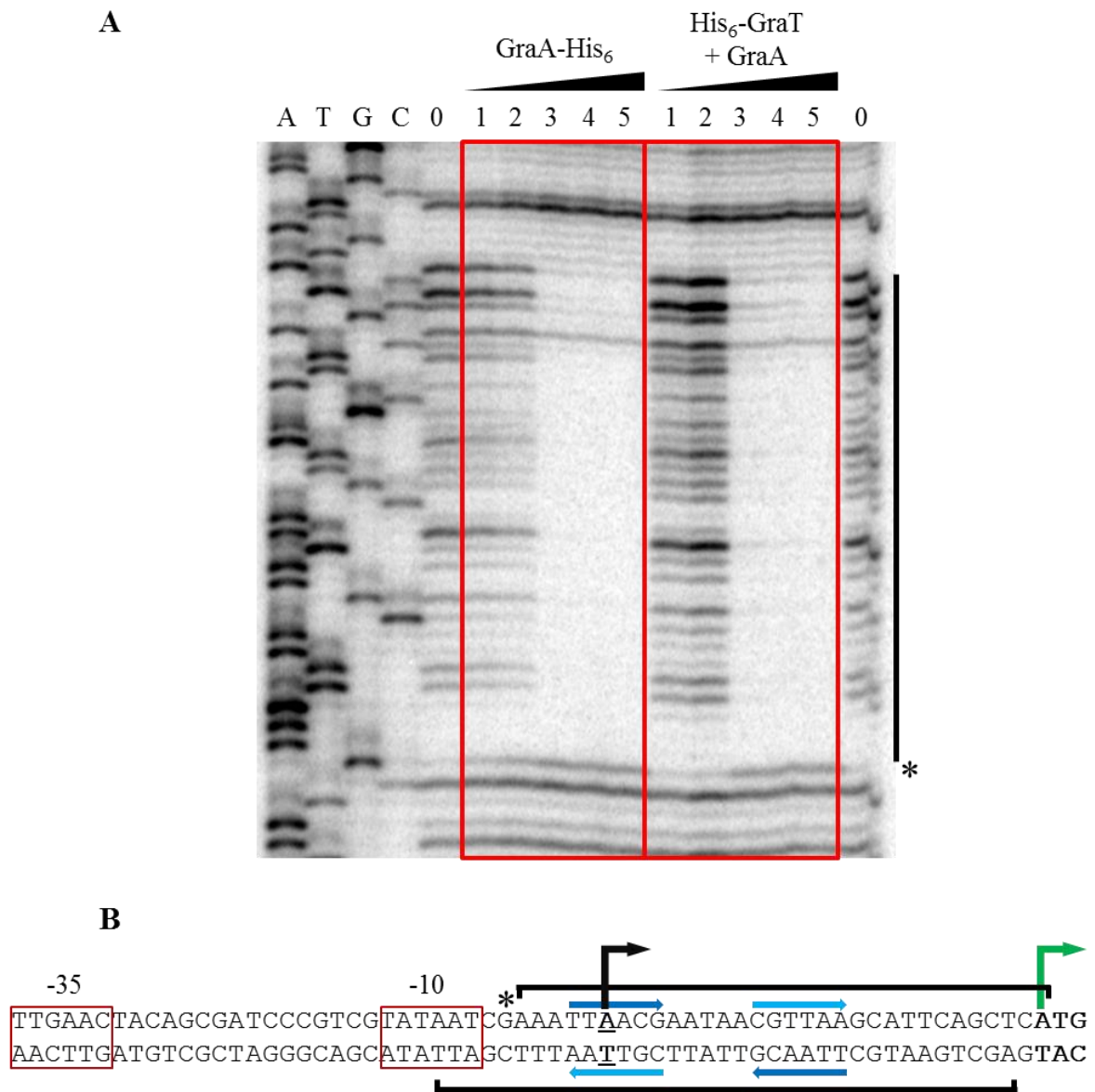
Joonisel 4 A on näha, et His<sub>6</sub>-GraT ja GraA ekspresseeruvad koos ning lahutuvad geelis selgelt vaatamata arvutusliku molekulmassi kõigest 0,4 kDa erinevusele (tabel 3). Võrdlus üksikuid valke ekspresseerinud rakkude lüsaatidega kinnitab, et kaht valku korraga ekspresseerinud rakkude totaallüsaadi rajal vastab His<sub>6</sub>-GraT-le ülemine tugev vöö, mis on olemas ka His<sub>6</sub>-GraT-d ekspresseerinud rakkude valgumustris, kuid samal ajal puudub GraA-His<sub>6</sub> ekspressiooni korral. Kahe valgu koos ekspresseerimisel on totaallüsaadis His<sub>6</sub>-GraT-d veidi rohkem kui GraA-d (joonis 4 A).

Joonisel 4 B on esitatud kõik seni puhastatud GraTA süsteemi valkude variandid. Ühelt plasmiidilt ekspresseeritud His<sub>6</sub>-GraT ja lisamärketa GraA puhastuvad Ni<sup>2+</sup>-kolonnilt koos ning ligikaudu võrdses koguses, kuigi totaallüsaadis oli GraT-d rohkem (joonis 4 A). See näitab, et GraA moodustab GraT-ga kompleksi, milles valkude suhe on 1:1 ning GraT N-terminuses olev His<sub>6</sub> märke ei sega nende interaktsiooni. Lisaks on puhaste valkude elektroforeesil näha, et kuigi GraA kummagi His-märkega variandi arvutuslik molekulmass on 11,7 kDa, liiguvad need geelis erineval kõrgusel ja mõlemad jäävad madalamale 11,3 kDa raskusest His<sub>6</sub>-GraT-st.

### 2.3.2 Nii GraA kui ka GraT-GraA kompleks seonduvad *graTA* promootorile

*GraTA* promootori aktiivsuse *in vivo* mõõtmise katsed näitasid, et antitoksiin GraA repressseerib *graTA* operoni transkriptsiooni. Samuti viitasid tulemused, et GraT pigem takistab kui toetab GraA-sõltuvat repressiooni (Tamman, 2012), mis on TA lookustele ebatüüpiline. Enamasti on nähtud, et promootori repressioon toimub tingimusliku kooperatiivsuse mehhanismiga, kus toksiin-antitoksiin kompleks seondub DNA-ga oluliselt afiinsemalt kui antitoksiin üksinda (Afif jt., 2001, Zhang jt., 2003). Et selgitada operoni repressiooni mehhanismi, kontrollisin esmalt antitoksiini ja toksiin-antitoksiin kompleksi promootoralaga seandumist *gel mobility shift* analüüsiga. Selgus, et nii antitoksiin üksi kui ka TA kompleks seonduvad promootorit sisaldavale DNA-le (tulemusi pole esitatud). Seandumisjärjestuse tuvastamiseks analüüsisin puhastatud His<sub>6</sub>-GraA, GraA-His<sub>6</sub> ja His<sub>6</sub>-GraT+GraA valkude afiinsust *graTA* operoni promootorala suhtes DNAas I jalajälje meetodil, mis näitas, et nii GraA-His<sub>6</sub> kui ka GraA kompleks His<sub>6</sub>-GraT-ga seonduvad *graTA* promootoralale (joonis 5 A). Üksiku antitoksiini ja toksiin-antitoksiin kompleksi seandumiskohad on identsed ning kasutatud katsetingimustel ei ole ka seandumise afiinsuses erinevusi näha (joonis 5 A). Samuti ei ole erinevusi N- ja C-terminaalse His-märkega GraA promootorile seandumises (tulemusi pole esitatud).

DNAas I jalajäljega tuvastatud antitoksiini seandumisalal leidub lühike täiuslik pöördkordusjärjestus (joonis 5 B), mis on tüüpiline dimeerina seonduvatele transkriptsioonifaktoritele. Seni sekveneeritud pseudomonaadidest leidub GraA seandumisjärjestusega täiesti identne 17-nukleotiidiline pöördkordusjärjestusega lõik TTAACGAATAACGTTAA veel *P. putida* F1, *P. fluorescens* F113 ja *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 genomides (Winsor jt., 2011) vahetult *graTA* lookuse homologide ees (tulemusi pole esitatud), mis viitab, et *graTA* operoni regulatsioon antitoksiiniga on erinevates pseudomonaadides konserveerunud. Lisaks määrati meie laboris 5'-RACE meetodit kasutades kindlaks ka *graTA* operoni transkriptsiooni alguspunkt (Tamman, avaldamata andmed), mis kattub pöördkordusjärjestusega (joonis 5 B).



**Joonis 5.** *graTA* operoni promootorala analüüs. A. GraA-His<sub>6</sub> ja His<sub>6</sub>-GraT+GraA kompleksi seondumisjärjestuse määramine *graTA* operoni promootoralal DNAas I jalajälje meetodil. 0-radadel antitoksiini ega toksiin-antitoksiin kompleksi ei lisatud, radadel 1-5 on vastavalt 0,45; 0,9; 4,5; 9 ja 45 pmol valku või valkkompleksi. Musta vertikaaljoonega on tähistatud DNAas I eest varjestatud ala, tärn märgib DNAas I lõikusele hüpersensitiivset saiti. B. *graTA* operoni promootorala skeem. Rohelise noolega on näidatud translatsiooni alguskoht, musta noolega ja allajoonitult on tähistatud transkriptsiooni alguspunkt. Mustade klambritega on tähistatud GraA seondumisel DNAas I eest varjestatud järjestused kummalgi DNA ahelal, tärn märgib DNAas I lõikusele hüpersensitiivset nukleotiidi. Sinised nooled tähistavad pöördkordusjärjestust. Kastides on ennustatud  $\sigma^{70}$ -sõltuva promootori -10 ja -35 heksameerid.

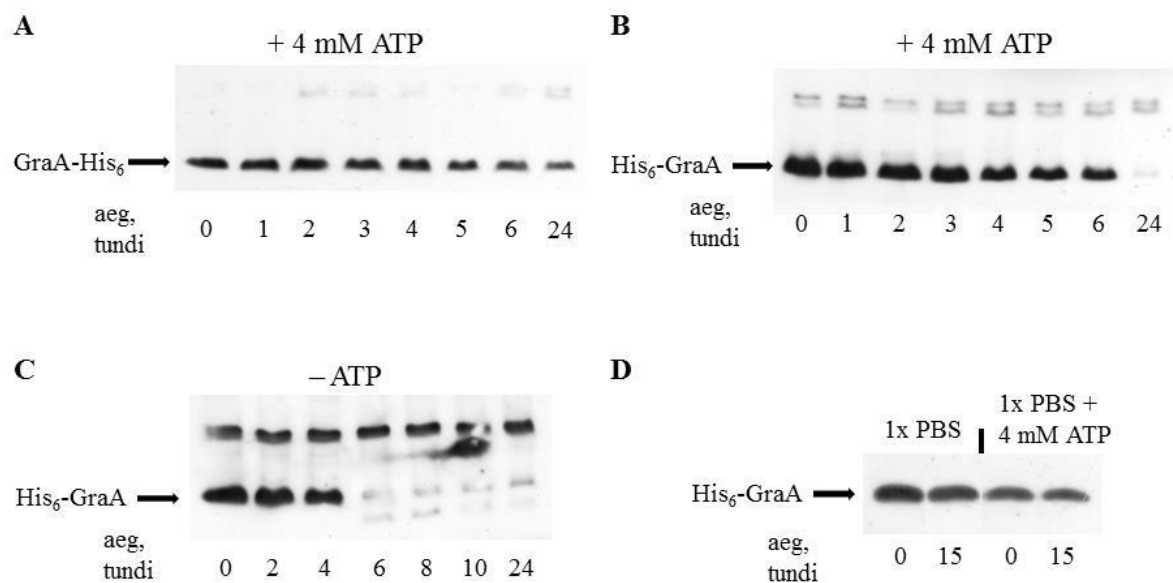
DNA järjestust analüüsides leidsin *graTA* promootoralalt mitmeid reguleerivaid elemente (joonis 5 B). Programm *Virtual Footprint* (Münch jt., 2005) ennustas *graTA* operoni

ette  $\sigma^{70}$ -sõltuva -10 heksameeri, mis osaliselt kattub GraA seondumisalaga. Lähtudes *E. coli*  $\sigma^{70}$ -sõltuvate promootorite konsensusjärjestusest, milleks on TTGACAN<sub>16-18</sub>TATAAT (Harley ja Reynolds, 1987), tuvastasin *graTA* promootoril ka konsensuselähedase -35 heksameeri (joonis 5 B).

GraA seondumisjärjestuse määramine näitab, et antitoksiin GraA toimib *graTA* operoni autorepressorina nii üksinda kui kompleksis GraT-ga. Promootorile seondudes varjastab GraA nii -10 heksameeri kui ka transkriptsiooni alguspunkti ning takistab seega ilmselt RNA polümeraasi seondumist promootorile.

### 2.3.3 Antitoksiin GraA on ebatavaliselt stabiilne valk

Antitoksiinid on tavaliselt küllalt ebastabiilsed valgud, mille eluiga rakus mõõdetakse minutitega (Camacho jt., 2002) ja sellega seoses võib nende puhastamine sageli olla raskendatud. Kuna GraA valgu kummagi His-märkega variandi puhastamine ei valmistanud probleeme isegi proteaasi inhibiitoreid kasutamata, otsustasin nii GraA-His<sub>6</sub> kui ka His<sub>6</sub>-GraA labiilsust testida.



**Joonis 6.** GraA-His<sub>6</sub> ja His<sub>6</sub>-GraA stabiilsuse määramine. Puhastatud GraA-His<sub>6</sub> (A) või His<sub>6</sub>-GraA (B) valku inkubeeriti *P. putida* rakulüsaadis, millele oli lisatud 4 mM ATP-d. Tulemused visualiseeriti His-peptiidi spetsiifilise HisProbe-HRP reagentiga. C. His<sub>6</sub>-GraA-d inkubeeriti *P. putida* rakulüsaadis, millele ei olnud täiendavat ATP-d lisatud. D. His<sub>6</sub>-GraA-d inkubeeriti puhvris ilma rakulüsaadita. Joonise osad A-C esindavad vähemalt kolmes sõltumatus katses nähtud tulemusi. Ühele rajale kantud reaktsioon sisaldas ~50 µg rakulüsaati, millele oli lisatud 3 pmol (0,035 µg) His<sub>6</sub>-GraA-d või 1,3 pmol (0,015 µg) GraA-His<sub>6</sub> valku.

Selgus, et rakulüsaadis inkubeerimisel väheneb GraA-His<sub>6</sub> hulk küll veidi, kuid üllatuslikult on valk hästi detekteeritav ka 24 tunni möödudes (joonis 6 A). Seevastu His<sub>6</sub>-GraA hulk väheneb juba esimese kuue tunni jooksul sujuvalt ning 24 tunni pärast on praktiliselt kogu valk lagundatud (joonis 6 B). Need tulemused näitavad, et antitoksiin GraA küll laguneb, kuid erinevalt senikirjeldatud antitoksiinidest on selleks kuluv aeg mõõdetav tundides.

Antitoksiini His-märkega variantide labiilsuse hindamiseks inkubeerisin kumbagi valku *P. putida* rakulüsaadis. Kuna antitoksiine lagundavad rakus eelkõige stressi korral indutseeritud ATP-sõltuvad proteaasid (Gerdes jt., 2005) tegin lüsaadi üleöö kasvanud statsionaarse faasi rakkudest ja lisan inkubatsioonisegudesse 4 mM ATP-d.

Et kontrollida võimalike ATP-sõltumatute lagundamismehhanismide olemasolu, inkubeerisin His<sub>6</sub>-GraA-d ka lüsaadis, millele ATP-d ei lisanud. Üllatuslikult langeb ilma ATP-ta lüsaadis His<sub>6</sub>-GraA hulk pärast 4-tunnist inkubatsiooni järsult ning lisaks ilmub nähtavale lühem histidiinirikas valk, mis on tõenäoliselt GraA N-terminust hõlmav laguprodukt (joonis 6 C). Algse His<sub>6</sub>-GraA hulga vähenemine ja madalamal liikuva valguvöödi teke oli jälgitav kolmes sõltumatus ilma lisa-ATP-ta tehtud katses, kuid valgu kiire lagundamise aeg varieerus kuuendast kaheksanda tunnini. C-terminaalse His<sub>6</sub>-märkega GraA puhul ei olnud täiendava ATP-ga ja ilma tehtud katsete vahel erinevusi näha ja valk ei lagunenu ühelgi tingimusel (tulemusi pole esitatud).

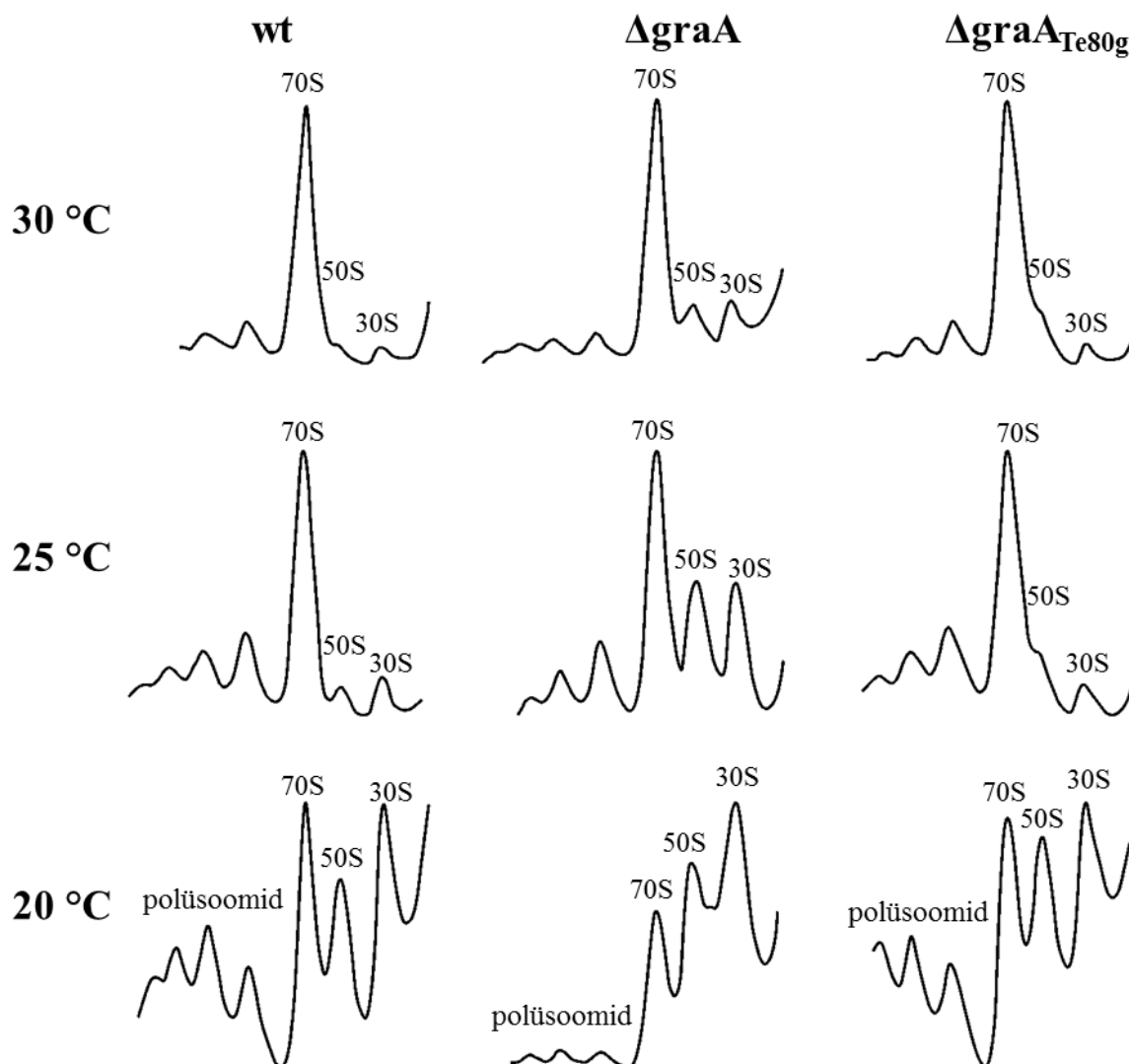
Kinnitamaks, et joonisel 6 B ja 6 C jälgitav N-terminaalse histidiinimärkega GraA hulga vähenemine tuleneb *P. putida* lüsaadi toimest, inkubeerisin His<sub>6</sub>-GraA-d ka samadel tingimustel ilma rakulüsaadita. Joonisel 6 D on näha, et 15 tunni jooksul ei muutu katses His<sub>6</sub>-GraA hulk ning seega on selle valgu nii ATP-sõltuvaks kui -sõltumatuks lagunemiseks vaja täiendavaid rakulisi faktoreid.

Nende katsete tulemused näitavad, et antitoksiin GraA on ebatavaliselt stabiilne valk, kuid siiski võib see teatud tingimustel laguneda. Lagunemine võib toimuda vähemalt kahe eri mehhanismi kaudu, mida mõjutab ATP olemasolu rakulüsaadis.

#### **2.3.4 GraT mõjutab *P. putida* ribosoomiprofiili**

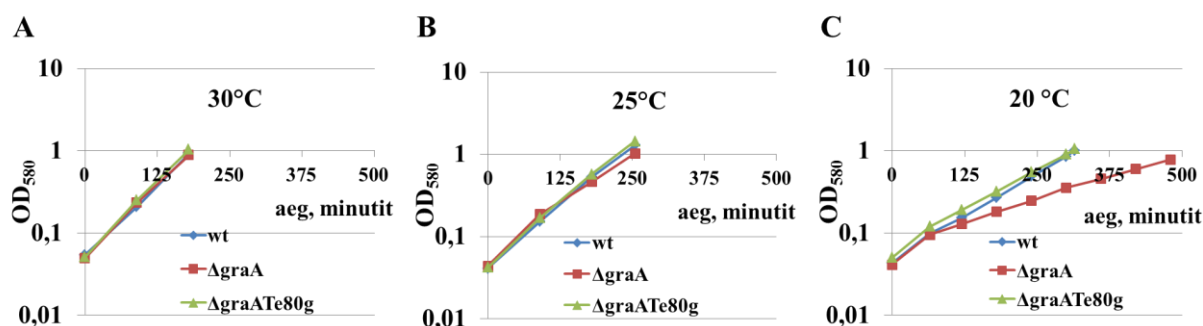
Järjestuse analüüsi kohaselt on toksiin GraT seni eksperimentaalselt kirjeldatud toksiinidest kõige sarnasem *V. cholerae* HigB-ga (Tamman, 2012), mis kuulub ribosoom-sõltuvate mRNAaside hulka (Hurley ja Woychik, 2009). Kontrollimaks, kas GraT põhjustatav kasvupeetus võiks tuleneda toksiini mõjust ribosoomidele, analüüsisin võrdlevalt algtüve ja

nii terve kui mutantse toksiiniga antitoksiini deletsioontüvede, vastavalt  $\Delta\text{graA}$  ja  $\Delta\text{graA}_{\text{Te80g}}$  ribosoomiprofiile. Kuna GraT põhjustatud kasvupeetus süveneb optimaalsest madalamal kasvutemperatuuril, kasvasin analüüsiks rakke nii tavapärase 30 °C kui ka 25 °C ja 20 °C juures ning kogusin ribosoomid eksponentsiaalse kasvufaasi rakkudest.



**Joonis 7.** *P. putida* algtüve ja antitoksiini deletsioontüvede ribosoomiprofiilid 15-40% sahharoosigradiendis. Ridades on kujutatud eri temperatuuridel kasvanud rakkude ribosoomiprofiilid, veergudes on vasakult paremale algtüvi (wt), antitoksiini deletsioontüvi ( $\Delta\text{graA}$ ) ja antitoksiini deletsioontüvi, milles on toksiin mutantne ( $\Delta\text{graA}_{\text{Te80g}}$ ). Profiilidel on tähistatud terviklikule ribosoomile (70S) ja vabadele ribosoomi subühikutele (50S ja 30S) vastavad piigid ning 20 °C juures määratud profiilidel ka polüsoomid. Ribosoomide eraldusel oli  $\text{Mg}^{2+}$  kontsentratsioon 12 mM. Algtüve ja  $\Delta\text{graA}$  profiilid 25 °C juures esindavad neljas sõltumatus katses jälgitud tulemusi, ülejäänud tüvesid ja temperatuure on testitud üks või kaks korda.

Ribosoomiprofiilide analüüs näitas, et temperatuuril 30 °C kasvatades ei olnud tüvede vahel märkimisväärsed erinevusi (joonis 7), mis on kooskõlas kõigi tüvede ühesuguse kasvukiirusega antud katseperioodi jooksul (joonis 8 A). 25 °C-l kasvanud  $\Delta$ graA tüves on 70S ribosoomidega võrreldes oluliselt rohkem vabu 50S ja 30S subühikuid kui algtüves (joonis 7). Kuna mutantse toksiiniga  $\Delta$ graA<sub>Te80g</sub> tüve ribosoomiprofiil sarnaneb algtüvele, siis võib järeldada, et  $\Delta$ graA tüve ribosoomifenotüübi põhjustab toksiin GraT. 25 °C juures jääb  $\Delta$ graA kasvus teistest tüvedest maha, kuigi lühikese katseperioodi tõttu ei ole see väga hästi märgatav (joonis 8 B). 20 °C juures kuhjuvad ka algtüves ja  $\Delta$ graA<sub>Te80g</sub> tüves vabad 50S ja 30S subühikud, kuid  $\Delta$ graA tüves on efekt siiski kõige suurem (joonis 7). Lisaks on  $\Delta$ graA rakkudes teistest oluliselt vähem polüsoome, mis viitab, et transleerivaid ribosoomide on vähem. Need defektid on kooskõlas ka  $\Delta$ graA tüve oluliselt vähenenud kasvukiirusega 20 °C juures (joonis 8 C).

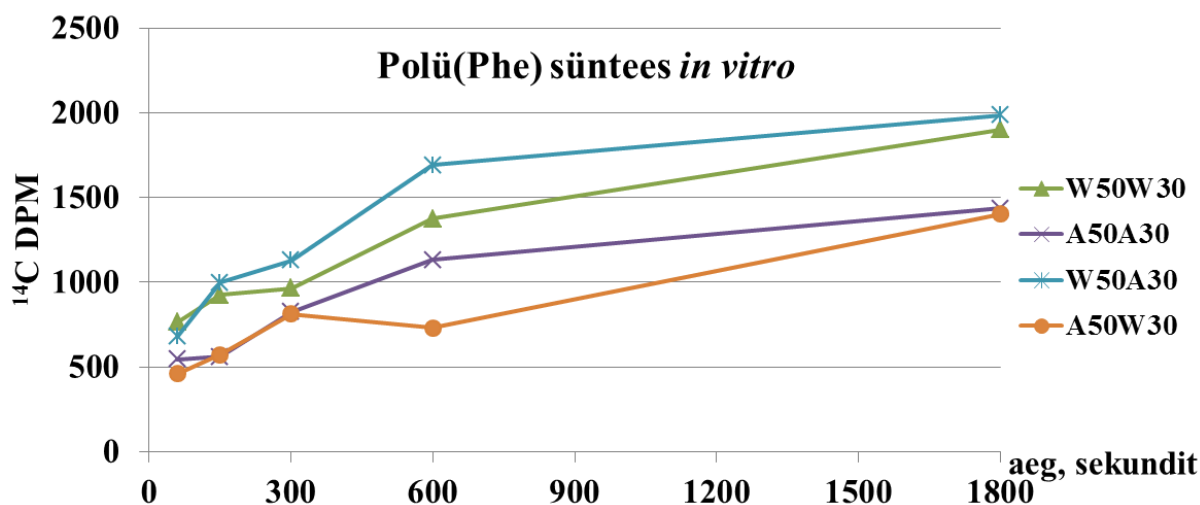


**Joonis 8.** Ribosoomiprofiili analüüsiks kasvatatud bakterikultuuride kasvukõverad. Näidatud on algtüve (wt),  $\Delta$ graA ja  $\Delta$ graA<sub>Te80g</sub> tüvede kasv 30 °C (A), 25 °C (B) ja 20 °C (C) juures. Rakke kasvatati kuni OD<sub>580</sub> ≈ 1 ja seejärel eraldati neist ribosoomid, mille analüüs on esitatud joonisel 7.

Kuna  $\Delta$ graA tüves kuhjuvad toksiini GraT mõjul vabad 50S ja 30S subühikud, tekkis küsimus, kas rakku kogunevad subühikud on aktiivsed või kahjustatud. Selle kontrollimiseks eraldasini algtüvest ja  $\Delta$ graA tüvest ribosoomi subühikud. Ribosoomide eraldamiseks kasvasin rakke 25 °C juures, kus tüvede kasvukiirused erinesid vähe (joonis 8 B) ja algtüve ribosoomiprofiilis ei olnud veel optimaalse 30 °C-ga võrreldes erinevusi, kuid  $\Delta$ graA tüves juba kuhjusid vabad subühikud (joonis 7). Algtüvest eraldasini 70S ribosoomid ja dissotsieerisin need eraldi 50S ja 30S fraktsioonideks.  $\Delta$ graA tüvest kogusin eraldi nii 70S ribosoomidest dissotsieeritud kui ka rakku kogunenud vabad 50S ja 30S subühikud. Ribosoomi subühikute aktiivsust mõõtsin *in vitro* translatsioonikatses puhaste translatsioonifaktoritega polü(U) matriitsilt <sup>14</sup>C märgisega polü(Phe) sünteesi võime järgi. Kuna *in vitro* translatsioonikatses moodustuvad terviklikud 70S ribosoomid eraldi puhastatud subühikute kokku segamisel, sain nii  $\Delta$ graA tüves rakku kuhjunud subühikute aktiivsuseid



eraldi mõõta. Kasutasin nii ainult algtüve kui ka ainult  $\Delta$ graA tüve subühikutest koosnevaid ribosome ning lisaks ka hübriide, kus üks subühik pärines algtüvest ja teine  $\Delta$ graA tüvest.



**Joonis 9.** *In vitro* valgusünteesi aktiivsus algtüve,  $\Delta$ graA tüve ning hübriidsete ribosoomidega. W50W30 – algtüve 50S ja 30S subühikud; A50A30 –  $\Delta$ graA 50S ja 30S subühikud; W50A30 – algtüve 50S ja  $\Delta$ graA 30S subühik; A50W30 –  $\Delta$ graA 50S ja algtüve 30S subühik. Sünteesitud  $^{14}\text{C}$ -märgiga polüfenüülalaniin koguti filtrile ning mõõdeti  $^{14}\text{C}$  lagunemiste arv minutis. Esitatud on pilootkatse tulemus.

Esialgsed *in vitro* valgusünteesi katsete tulemused viitavad, et algtüve subühikutest moodustatud 70S ribosoomid on translatsiooniliselt aktiivsemad kui  $\Delta$ graA rakkudesse kuhjunud vabadest subühikutest koostatud ribosoomid (joonis 9). Algtüve 50S ja  $\Delta$ graA 30S subühikust koosnevate ribosoomide translatsiooniaktiivsus on võrreldav pigem algtüvega, kuid  $\Delta$ graA 50S ja algtüve 30S subühikutest koosnevate ribosoomide aktiivsus sarnaneb  $\Delta$ graA ribosoomidega (joonis 9). See viitab, et toksiin GraT mõjutab eelkõige ribosoomide 50S subühikuid.

## 2.4 Arutelu

### 2.4.1 GraTA on II tüüpi TA süsteem

*Pseudomonas putida* valgud GraT ja GraA moodustavad funktsionaalse toksiin-antitoksiin süsteemi (Tamman, 2012). GraT on toksiin, mis vähendab bakteri kasvukiirust ning mille efekt avaldub tugevamini madalamal temperatuuril. GraA on antitoksiin, mis neutraliseerib GraT kasvu pärssiva mõju. Valgujärjestuste sarnasuse (Tamman, 2012) ja operoni ülesehituse (joonis 3) põhjal paigutub GraTA TA süsteemide HigBA perekonda, mille toksiinid on ribosoom-sõltuvad mRNAasid. Käesolevas töös kirjeldasin lähemalt kummagi valgu toimemehhanisme.

Töös saadud tulemused kinnitavad, et GraTA on II tüüpi toksiin-antitoksiin süsteem, mille valgud seonduvad omavahel otseselt. Seondumist näitab selgelt His<sub>6</sub>-GraT ja GraA koospuhastumine Ni<sup>2+</sup>-kolonnilt. Puhastatud valkude 1:1 suhe on kooskõlas HigBA süsteemide kohta varem saadud tulemustega, kus märkega toksiin ja märketa antitoksiin samuti võrdses suhtes koos puhastusid (Tian jt., 2001). See, et toksiini N-terminuses olev His-peptiid ei takista antitoksiiniga seondumist, viitab, et vähemalt toksiini kõige N-terminaalsem osa ei osale valk-valk interaktsioonis. Huvitaval kombel on His<sub>6</sub>-GraT-d ja GraA-d ekspresseerinud rakkude lüsaadis näha, et toksiin ekspresseerub efektiivsemalt ja on antitoksiini suhtes ülehulgas (joonis 4 A). See võib tuleneda geenide paigutusest: *graT* geen on operonis *graA* ees ja võib olla eelistatult transleeritud. Puhastamisel on His<sub>6</sub>-GraT ja GraA aga ligikaudu võrdses koguses, mis viitab, et vaba toksiin kaob *E. coli* rakkudest suhteliselt kiiresti, kuid kompleksis antitoksiiniga on stabiilne.

Reeglina osalevad TA süsteemide transkriptsiooni regulatsioonis nii toksiin kui ka antitoksiin. Antitoksiinid on DNA-d siduvad valgud ning TA operoni promootoralale seondudes repressseerivad nad transkriptsiooni (Gerdes jt., 2005). Enamikes uuritud süsteemides on leitud, et repressioon toimub tingimusliku kooperatiivsuse mehhanismi kaudu (joonis 2, Gerdes ja Maisonneuve, 2012). Toksiini ja antitoksiini suhtest olenevalt võivad toksiinid kas seondumist võimendada või seda takistada. *GraTA* operoni promootori aktiivsuse mõõtmine näitas, et antitoksiini puudumisel on promootor algsest aktiivsem ning toksiini puudumisel algsest rohkem repressseeritud (Tamman, 2012). Sellest järeldati, et antitoksiin repressseerib operoni transkriptsiooni, kuid toksiin-antitoksiin kompleks tõenäoliselt seda ei tee.

DNaas I jalajälje analüüs kinnitas, et antitoksiin seondub *graTA* operoni promootorile, kuid lisaks selgus, et ka toksiin-antitoksiin kompleks seondub samale DNA piirkonnale. Kuna antitoksiini ja GraT-GraA valkkompleksi seondumisasiinsused *in vitro* ei erinenud, võib järeldada, et *graTA* promootori represseerimisel on mõlemad ühtviisi efektiivsed. Tõenäoliselt seondub toksiin-antitoksiin kompleks tervikuna DNA-ga ja nähtud seondumist ei põhjusta kompleksist dissotsieerunud antitoksiin. Esiteks on toksiin-antitoksiin kompleks stabiilne ja ei lagune ka 0,5 M NaCl juures (tingimustel, mida kasutati kompleksi puhastamisel), mis kõrvaldab mittespetsiifilised ja nõrgad interaktsioonid. Teisalt peaks dissotsiatsioonil valitsema tasakaaluline seisund, kus antitoksiin on jaotunud toksiini ja DNA vahel. Kuna katsetes kasutati antitoksiini ja TA kompleksi võrdsetes moolkogustes, peaks dissotsieerunud antitoksiini olema DNA-ga seondunud märgatavalt vähem kui puhast valku kasutades. Pigem võib deletsioontüvedes saadud promootoraktiivsuste erinevus tuleneda valkude erinevast ekspressioonitasemest.  $\Delta$ graT tüves võib antitoksiini, mida kodeerib algses operonis tagumine geen, ekspressioon juba valmis sünteesitud mRNA-delt olla tugevam kui algtüves. Seega võiks tasakaal antitoksiini sünteesi ja lagundamise vahel nihkuda rohkem sünteesi suunas, mis omakorda tähendaks rohkem operoni represseerivat antitoksiini. Samas on võimalik, et *in vitro* katsed ei peegelda seondumisasiinsuste osas tegelikku rakusisest olukorda ning antitoksiin seondub *in vivo* DNA-ga üksi siiski paremini kui kompleksis toksiiniga. Sarnast olukorda on kirjeldatud *E. coli* MqsRA süsteemis, kus toksiin MqsR dissotsieerib MqsA-DNA kompleksi (Brown jt., 2013).

Kuigi puhta antitoksiini ja TA kompleksi ühesugune afiinsus operaator-DNA-le viitab, et *graTA* operoni regulatsioon ei toimu tingimusliku kooperatiivsuse mehhanismiga (joonis 2), ei saa seda täielikult välistada, kuna oleme testinud ainult 1:1 suhtega kompleksi seondumist. Kirjandusest on teada, et Rts1 plasmidi toksiin HigB korepresseerib *higBA* operoni (Tian jt., 1996), kuid *V. cholerae* HigB ei paista seda tegevast (Budde jt., 2007). Samas ei ole kummaski töös tehtud DNA-ga seondumise katseid toksiin-antitoksiin vahekorda varieerides. Tingimusliku kooperatiivsuse olemasolu või puudumist GraTA süsteemis saaks täpsemalt kirjeldada, kui His<sub>6</sub>-GraT-GraA kompleks dissotsieerida ja kasutada valke erinevas suhtes näiteks *gel mobility shift* või DNaas I jalajälje reaktsioonides.

#### **2.4.2 GraA on ebatavaliselt stabiilne antitoksiin**

Puhastatud antitoksiini stabiilsuse testimine *in vitro* näitas, et GraA on ebatavaliselt stabiilne antitoksiin. Kui seni uuritud antitoksiinide eluiga rakus on mõõdetav minutite

(Camacho jt., 2002) või äärmisel juhul mõne tunniga (Lehnherr ja Yarmolinsky, 1995), siis GraA täielikuks lagunemiseks *P. putida* rakulüsaadis kulus mitmeid tunde kuni ööpäev.

Katsetest selgus, et His<sub>6</sub>-märke asukoht mõjutab GraA stabiilsust ning C-terminaalse mäkega GraA on oluliselt stabiilsem kui N-terminaalse mäkega variant (joonis 6 A ja B). See on kooskõlas kirjanduse andmetega, mille kohaselt on enamike antitoksiinide C-terminaalne osa enne toksiiniga seondumist korrapärase struktuuriga ning seega heaks substraadiks proteaasidele (Kamada jt., 2003, Nieto jt., 2007). N-terminaalse His<sub>6</sub>-mäkega GraA puhul on seevastu tuvastatavad kaks erinevat lagunemist rada, mis mõlemad sõltuvad rakulüsaadi faktoritest, sest vaid puhvris inkubeerides antitoksiin ei lagune.

ATP-sõltuvalt väheneb GraA hulk ajas ühtlaselt ning valk laguneb 24 tunni jooksul peaaegu täielikult (joonis 6 B). See on küll väga aeglane lagunemine, kuid vastab hästi ATP-sõltuvate proteaaside, nagu näiteks Lon ja Clp, üldisele toimemehhanismile. Reeglina tunnevad proteaasid ära ühe valguga terminuse ning seejärel volditakse valk peptiidahela otsast alates ATP-sõltuvalt lahti ning kogu valk lagundatakse (Sauer ja Baker, 2011).

GraA võib laguneda ka ATP-sõltumatult, kuid selle lagunemise dünaamika on silmatorkavalt ebaühtlane. Nimelt püsib GraA *P. putida* rakulüsaadis ATP puudumisel esimese 4-6 tunni jooksul suhteliselt stabiilsena, kuid seejärel toimub valguga äkiline lagundamine, millega kaasneb lühemale histidiinirikikale valgule vastava valguvöödi ilmumine (joonis 6 C). Tõenäoliselt on see GraA N-terminaalne His<sub>6</sub>-mäkega osa. Kuna tekkinud laguprodukti vööt on geelis suhteliselt terav, siis viitab see, et ATP-sõltumatu lagunemine on spetsiifiline ja mingi lüsaadis leiduv endoproteaas lõikab GraA-d kindlas positsioonis.

Kuna saadud tulemused ei andnud GraA lagundamise täpse mehhanismi kohta infot, ei saa teha ka järeldusi GraTA süsteemi regulatsioonist antitoksiini lagundamise kaudu. Lagundamismehhanismide täpsustamiseks võiks katset senisel kujul korrata *P. putida* levinumate stressis indutseeritavate proteaaside suhtes mutantsete tüvede lüsaatidega. Liigispetsiifika määramiseks saaks kasutada ka *E. coli* lüsaate. Lisaks võiks edasisteks katseteks konstrueerida *P. putida* genoomse His<sub>6</sub>-GraA üleekspressioonitüve, millega saaks antitoksiini eluiga mõõta *in vivo* ja sedasi erinevaid katsetingimusi kasutades selgitada GraTA süsteemi aktivatsiooni regulatsiooni.

### 2.4.3 GraT takistab 70S ribosoomide moodustumist 50S subühiku kaudu

Selleks et selgitada, kas sarnaselt teistele HigB perekonna toksiinidele (Hurley ja Woychik, 2009) mõjutab ka GraT translatsiooni, analüüsisin toksiooni mõju ribosoomide profiilile. Tulemused näitasid, et GraT mõjul kuhjuvad rakus vabad 50S ja 30S subühikud ning vastavalt langeb 70S ribosoomide suhteline hulk. See on omapärane tulemus, kuna enamike seni uuritud ribosoom-sõltuvate mRNAaside, sealhulgas HigB ja RelE, mõju bakteri ribosoomide profiilile on vastupidine. Nende üleekspressiooni korral on nähtud pigem 70S ribosoomide suhtelise hulga tõusu võrreldes vabade subühikutega (Hurley ja Woychik, 2009, Zhang ja Inouye, 2009, Zhang jt., 2009). HigB puhul arvatakse, et 70S ribosoomide hulga kasv võib tuleneda sellest, et mRNA-de intensiivse lõikamise tõttu peatuvad ribosoomid mRNA fragmentidel. Peatunud ribosoomid vabastav tmRNA süsteem töötab ilmselt täiskoormusel, kuid ribosoomide retsükleerumise kiirus langeb siiski ja 70S ribosoomide hulk tõuseb (Hurley ja Woychik, 2009).

GraT mõju ribosoomide profiilile ei sarnane niivõrd mRNAassete toksiinidega, vaid pigem *E. coli* RatA-ga. RatA ei lõika mRNA-sid, vaid seondub 50S subühikule ja takistab subühikute assotsiatsiooni ning inhibeerib seeläbi translatsiooni initsiatsiooni (Zhang ja Inouye, 2011). Sarnast vabade subühikute hulga kasvu on kirjeldatud ka ühe ribosoom-sõltumatu RNAasse aktiivsusega toksiooni, *Mycobacterium tuberculosis*-e MazF-mt6, puhul. See toksiin lõikab vabades 50S subühikutes 23S rRNA heeliks/ling 70-t, mis asub subühikute vahelise kontakti moodustamiseks olulises rRNA piirkonnas (Schifano jt., 2013). GraT puhul on pigem alust arvata, et toksiin võiks toimida otseselt subühikute seondumist takistades, kuna nii RatA kui GraT mõjul tõusis vabade subühikute hulk oluliselt rohkem, kui MazF-mt6 üleekspressioonil. Siiski tuleks mehhanismi selgitamiseks ka teist varianti kontrollida ja edasise töö käigus analüüsida GraT mõjutatud ribosoomide rRNA terviklikkust.

Käesolevas töös saadud tulemused viitavad, et GraT on toksiin, mis mõjutab eelkõige ribosoomi 50S subühikut. Seda toetab esmane *in vitro* translatsioonikatse, mille tulemuste järgi olid  $\Delta$ graA tüve 50S subühikut sisaldavad ribosoomid umbes 25% võrra väiksema translatsiooniaktiivsusega kui algtüve omad. Siin on siiski tegemist esialgse tulemusega ning *in vitro* katsesüsteem võib vajada täiendavat optimeerimist, et tagada kõige korrektsemad tulemused.

Seni uuritud ribosoomiga seonduvate toksiinide puhul on *Western blot* meetodil sahharoosgradiendi fraktsioone analüüsides leitud, et toksiinid seonduvad 50S subühikuga (Hurley ja Woychik, 2009, Zhang ja Inouye, 2009, Zhang jt., 2009). Seetõttu on 50S subühiku

mõjutamine HigB-sarnase GraT jaoks ootuspärane tulemus. Edasiste katsete käigus, kui õnnestub saada GraT vastased antikehad, tuleks välja selgitada, kas puhastatud ribosoomifraktsioonides leidub GraT-d ja kumma subühikuga toksiin seondub.

#### **2.4.4 GraTA ei pruugi kuuluda HigBA TA perekonda**

Saadud tulemusi kokku võttes võib kahtluse alla seada GraTA süsteemi kuulumise HigBA perekonda. Valgujärjestuste analüüsi kohaselt on seni uuritud süsteemidest GraTA-le kõige sarnasem *Vibrio cholerae* HigBA, kuid isegi nende puhul ei ole valgud väga sarnased ning identsusprotsent jääb nii toksiini kui ka antitoksiini jaoks alla 40 (Tamman, 2012). HigBA süsteemile sarnaselt on ka *graTA* operonis toksiin esimene geen. Samuti on mõlema süsteemi puhul nähtud valkude koospuhastumist võrdses suhtes (Tian jt., 2001). Süsteemide funktsioonides leidub aga mitmeid erinevusi.

Esiteks on GraT oluliselt vähemtoksiline valk kui näiteks *V. cholerae* või *M. tuberculosis*-e HigB, milledele vastava antitoksiini HigA deletsioon on rakkudele letaalne (Budde jt., 2007, Fivian-Hughes ja Davis, 2010), samas kui GraA deleteerimine ei valmista raskusi ja põhjustab vaid bakterite kasvukiiruse vähenemist (Tamman, 2012). GraA on ka ebaharilikult stabiilne antitoksiin. HigA antitoksiinide eluiga ei ole küll otse mõõdetud, kuid kirjeldatud on Lon proteaasi olulisust *E. coli* HigBA regulatsioonis, mis viitab antitoksiini aktiivsele lagundamisele *in vivo* (Christensen-Dalsgaard jt., 2010). Lisaks viitavad käesoleva töö tulemused, et kuigi ka GraT mõjutab ribosoomi, on selle toimemehhanism erinev mRNA-s HigB-st ja pigem võiks GraT toimida ribosoomide assotsiatsiooni inhibiitorina. Iseenesest ei oleks sarnaste toksiinide erinev funktsioon üllatav. Näiteks kuulub DNA gürasii inhibiitor ParE nii järjestuse kui struktuuri alusel ühte superperekonda ribosoom-sõltuva mRNA-si RelE-ga (Anantharaman ja Aravind, 2003, Dalton ja Crosson, 2010), mis näitab, et evolutsiooni käigus võivad toksiinid omandada uusi funktsioone. Kui edasised katsed kinnitavad, et GraT toimemehhanismid erinevad HigB omadest, tasuks kaaluda GraTA süsteemi paigutamist iseseisvasse *hig*-sarnaste TA süsteemide alamperekonda.

## Kokkuvõte

Esimene *Pseudomonas putida*-s kirjeldatud toksiin-antitoksiin süsteem GraTA on teistes bakterites lähemalt uuritud süsteemidega võrreldes ebatüüpiliste omadustega. Eelkõige väljendub see toksiini GraT mõõdukas efektis rakkude kasvukiirusele, mis omakorda sõltub kasvutingimustest. Varasemalt oleme kirjeldanud GraT efekte *in vivo* ning tõestanud funktsionaalsete katsetega, et tegemist on toimiva TA süsteemiga (Tamman, 2012).

Käesoleva töö eesmärgiks oli selgitada GraTA süsteemi toimimist ja regulatsiooni peamiselt *in vitro* katsetega ning analüüsida toksiini efekte bakteri ribosoomide profiilile. Tulemused võib kokku võtta järgmiselt:

1. GraTA kuulub tüüp II TA süsteemide hulka, kus toksiin ja antitoksiin moodustavad omavahel kompleksi.
2. *In vitro* seonduvad nii GraA kui GraA-GraT kompleks *graTA* operoni promootoralal olevale täiuslikule pöördkordusjärjestusele ja varjestavad promootoril RNA polümeraasi seondumisel olulise  $\sigma^{70}$ -sõltuva -10 regiooni.
3. GraA on antitoksiini kohta ebaharilikult stabiilne valk.
4. GraT pidurdab bakteri kasvu translatsiooni inhibeerides ja takistab ribosoomi subühikute assotsiatsiooni ilmselt 50S subühiku mõjutamise kaudu.

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et GraTA süsteem on mitmes mõttes omapärane. Seni ei ole kirjeldatud GraA-ga samaväärselt stabiilset antitoksiini ning sellega seoses tekib ka küsimus, kuidas toimub sel juhul süsteemi aktiveerumise regulatsioon. Lisaks on huvitav GraT mõju ribosoomide assotsiatsioonile, millesarnast on varem kirjeldatud vaid RatA-l ja ühel erandlikul MazF tüüpi toksiinil, aga mitte GraT-le kõige sarnasematel HigB toksiinidel. Edasise töö käigus on vaja süsteemi täpsemaks kirjeldamiseks selgitada, kuidas GraT täpselt ribosoomi mõjutab ning samuti tuleks uurida antitoksiini GraA stabiilsust elusrakkudes.

# Characterization of the GraTA type II toxin-antitoxin system of *Pseudomonas putida*

Andres Ainelo

## Summary

Toxin-antitoxin (TA) systems are widespread in free-living bacteria who have to survive in constantly changing and often hostile environments. These genetic elements most often code for two small proteins: a toxin that impedes cell growth and an antitoxin that represses the effects of the toxin under optimal growth conditions. Under stress, the more labile antitoxins are degraded by cellular proteases and the stable toxins, released from inhibition, stop cell growth via a variety of mechanisms. At first, TA systems were mostly considered important in the generation of multidrug tolerant persister cells but nowadays they are also acknowledged as mediators and effectors in the general stress response of bacteria.

Our research group is studying the GraTA system of *Pseudomonas putida*, which is the first toxin-antitoxin system to be experimentally described in pseudomonads. We have previously shown that the *graTA* locus codes for a functional TA system that belongs to the HigBA family according to sequence similarity. However, the effects of the toxin GraT are relatively mild. It is possible to generate a GraA antitoxin deletion strain, which shows a somewhat reduced growth rate (Tamman, 2012), whereas previously described attempts of deleting other TA systems' antitoxin genes have been unsuccessful.

The aims of this study were to clarify GraTA system's mechanisms of action using mostly *in vitro* experiments and to compare them with those previously described for similar systems. The results can be summarized as follows:

1. GraTA is a type II TA systems, where the antitoxin represses the toxin by direct protein complex formation.
2. Both the antitoxin GraA and the GraA-GraT complex bind the promoter of the *graTA* operon and block a  $\sigma^{70}$ -dependent -10 region that is important for RNA polymerase binding.
3. GraA is an unusually stable antitoxin *in vitro*.
4. GraT slows bacterial growth by inhibiting translation and disturbs ribosome subunit association, most likely by affecting the 50S subunit.



These results suggest that GraTA is an unusual TA system. The antitoxin GraA is exceptionally stable, which leaves the question of how the activation of the system is regulated. The effect of GraT on the ribosomes is also noteworthy as subunit association prevention has not been associated with HigB-like toxins until now. Further studies should describe the toxin's mechanism of action in more detail and assess antitoxin degradation *in vivo*.

## **Tänu sõnad**

Sooviksin eelkõige tänada oma juhendajat Ritat, kes on aidanud mul toksiinide ja antitoksiinide kirjuse maailmas orienteeruda, ja Hedvigit, kellele meeldib teha katseid, mis mulle ei meeldi, ning lisaks ka kõiki teisi laborikaaslasi, kes löid meeldiva töökeskkonna. Eraldi sooviksin veel tänada Jaanus Remmet võimaluse eest ribosoomikatseid teha ning Margus Leppikut ja Aivar Liivi nende katsete praktilise juhendamise eest.

## Kasutatud kirjandus

- Afif, H., N. Allali, M. Couturier & L. Van Melderen (2001). "The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the *ccd* poison-antidote system." Mol Microbiol **41**(1): 73-82.
- Aizenman, E., H. Engelberg-Kulka & G. Glaser (1996). "An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6059-6063.
- Amitai, S., I. Kolodkin-Gal, M. Hananya-Meltabashi, A. Sacher & H. Engelberg-Kulka (2009). "*Escherichia coli* MazF leads to the simultaneous selective synthesis of both "death proteins" and "survival proteins"." PLoS Genet **5**(3): e1000390.
- Anantharaman, V. & L. Aravind (2003). "New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system." Genome Biol **4**(12): R81.
- Bayley, S. A., C. J. Duggleby, M. J. Worsey, P. A. Williams, K. G. Hardy & P. Broda (1977). "Two modes of loss of the Tol function from *Pseudomonas putida* mt-2." Mol Gen Genet **154**(2): 203-204.
- Blower, T. R., G. P. Salmond & B. F. Luisi (2011). "Balancing at survival's edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin-antitoxin partners." Curr Opin Struct Biol **21**(1): 109-118.
- Bøggild, A., N. Sofos, K. R. Andersen, A. Feddersen, A. D. Easter, L. A. Passmore & D. E. Brodersen (2012). "The crystal structure of the intact *E. coli* RelBE toxin-antitoxin complex provides the structural basis for conditional cooperativity." Structure **20**(10): 1641-1648.
- Brown, B. L., D. M. Lord, S. Grigoriu, W. Peti & R. Page (2013). "The *Escherichia coli* toxin MqsR destabilizes the transcriptional repression complex formed between the antitoxin MqsA and the *mqsRA* operon promoter." J Biol Chem **288**(2): 1286-1294.
- Brown, B. L., T. K. Wood, W. Peti & R. Page (2011). "Structure of the *Escherichia coli* antitoxin MqsA (YgiT/b3021) bound to its gene promoter reveals extensive domain rearrangements and the specificity of transcriptional regulation." J Biol Chem **286**(3): 2285-2296.
- Budde, P. P., B. M. Davis, J. Yuan & M. K. Waldor (2007). "Characterization of a *higBA* toxin-antitoxin locus in *Vibrio cholerae*." J Bacteriol **189**(2): 491-500.
- Bukowski, M., A. Rojowska & B. Wladyka (2011). "Prokaryotic toxin-antitoxin systems--the role in bacterial physiology and application in molecular biology." Acta Biochim Pol **58**(1): 1-9.
- Camacho, A. G., R. Misselwitz, J. Behlke, S. Ayora, K. Welfle, A. Meinhart, B. Lara, W. Saenger, H. Welfle & J. C. Alonso (2002). "In vitro and in vivo stability of the epsilon2zeta2 protein complex of the broad host-range *Streptococcus pyogenes* pSM19035 addiction system." Biol Chem **383**(11): 1701-1713.
- Cataudella, I., A. Trusina, K. Sneppen, K. Gerdes & N. Mitarai (2012). "Conditional cooperativity in toxin-antitoxin regulation prevents random toxin activation and promotes fast translational recovery." Nucleic Acids Res **40**(14): 6424-6434.
- Christensen-Dalsgaard, M. & K. Gerdes (2006). "Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids." Mol Microbiol **62**(2): 397-411.
- Christensen-Dalsgaard, M., M. G. Jorgensen & K. Gerdes (2010). "Three new RelE-homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses." Mol Microbiol **75**(2): 333-348.

- Christensen, S. K., M. Mikkelsen, K. Pedersen & K. Gerdes (2001). "RelE, a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14328-14333.
- Christensen, S. K., K. Pedersen, F. G. Hansen & K. Gerdes (2003). "Toxin-antitoxin loci as stress-response-elements: ChpAK/MazF and ChpBK cleave translated RNAs and are counteracted by tmRNA." J Mol Biol **332**(4): 809-819.
- Dalton, K. M. & S. Crosson (2010). "A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex." Biochemistry **49**(10): 2205-2215.
- Donegan, N. P., E. T. Thompson, Z. Fu & A. L. Cheung (2010). "Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **192**(5): 1416-1422.
- Fineran, P. C., T. R. Blower, I. J. Foulds, D. P. Humphreys, K. S. Lilley & G. P. Salmond (2009). "The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(3): 894-899.
- Fivian-Hughes, A. S. & E. O. Davis (2010). "Analyzing the regulatory role of the HigA antitoxin within *Mycobacterium tuberculosis*." J Bacteriol **192**(17): 4348-4356.
- Fozo, E. M., M. R. Hemm & G. Storz (2008). "Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them." Microbiol Mol Biol Rev **72**(4): 579-589, Table of Contents.
- Garcia-Pino, A., S. Balasubramanian, L. Wyns, E. Gazit, H. De Greve, R. D. Magnuson, D. Charlier, N. A. van Nuland & R. Loris (2010). "Allostery and intrinsic disorder mediate transcription regulation by conditional cooperativity." Cell **142**(1): 101-111.
- Gerdes, K., S. K. Christensen & A. Lobner-Olesen (2005). "Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci." Nat Rev Microbiol **3**(5): 371-382.
- Gerdes, K. & E. Maisonneuve (2012). "Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci." Annu Rev Microbiol **66**: 103-123.
- Gerdes, K., P. B. Rasmussen & S. Molin (1986). "Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3116-3120.
- Guglielmini, J. & L. Van Melderden (2011). "Bacterial toxin-antitoxin systems: Translation inhibitors everywhere." Mob Genet Elements **1**(4): 283-290.
- Harley, C. B. & R. P. Reynolds (1987). "Analysis of *E. coli* promoter sequences." Nucleic Acids Res **15**(5): 2343-2361.
- Hayes, F. (2003). "Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest." Science **301**(5639): 1496-1499.
- Hu, Y., M. J. Benedik & T. K. Wood (2012). "Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE." Environ Microbiol **14**(3): 669-679.
- Hurley, J. M., J. W. Cruz, M. Ouyang & N. A. Woychik (2011). "Bacterial toxin RelE mediates frequent codon-independent mRNA cleavage from the 5' end of coding regions in vivo." J Biol Chem **286**(17): 14770-14778.
- Hurley, J. M. & N. A. Woychik (2009). "Bacterial toxin HigB associates with ribosomes and mediates translation-dependent mRNA cleavage at A-rich sites." J Biol Chem **284**(28): 18605-18613.
- Jensen, R. B. & K. Gerdes (1995). "Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems." Mol Microbiol **17**(2): 205-210.
- Kamada, K., F. Hanaoka & S. K. Burley (2003). "Crystal structure of the MazE/MazF complex: molecular bases of antidote-toxin recognition." Mol Cell **11**(4): 875-884.
- Kedzierska, B., L. Y. Lian & F. Hayes (2007). "Toxin-antitoxin regulation: bimodal interaction of YefM-YoeB with paired DNA palindromes exerts transcriptional autorepression." Nucleic Acids Res **35**(1): 325-339.
- Lehnherr, H. & M. B. Yarmolinsky (1995). "Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3274-3277.

- Leplae, R., D. Geeraerts, R. Hallez, J. Guglielmini, P. Dreze & L. Van Melderren (2011). "Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families." Nucleic Acids Res **39**(13): 5513-5525.
- Liu, M., Y. Zhang, M. Inouye & N. A. Woychik (2008). "Bacterial addiction module toxin Doc inhibits translation elongation through its association with the 30S ribosomal subunit." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5885-5890.
- Madl, T., L. Van Melderren, N. Mine, M. Respondek, M. Oberer, W. Keller, L. Khatai & K. Zangger (2006). "Structural basis for nucleic acid and toxin recognition of the bacterial antitoxin CcdA." J Mol Biol **364**(2): 170-185.
- Maisonneuve, E., L. J. Shakespeare, M. G. Jorgensen & K. Gerdes (2011). "Bacterial persistence by RNA endonucleases." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(32): 13206-13211.
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Münch, R., K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, J. Klein, M. Schobert & D. Jahn (2005). "Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes." Bioinformatics **21**(22): 4187-4189.
- Neubauer, C., Y. G. Gao, K. R. Andersen, C. M. Dunham, A. C. Kelley, J. Hentschel, K. Gerdes, V. Ramakrishnan & D. E. Brodersen (2009). "The structural basis for mRNA recognition and cleavage by the ribosome-dependent endonuclease RelE." Cell **139**(6): 1084-1095.
- Nieto, C., I. Cherny, S. K. Khoo, M. G. de Lacoba, W. T. Chan, C. C. Yeo, E. Gazit & M. Espinosa (2007). "The *yefM-yoeB* toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*: functional and structural correlation." J Bacteriol **189**(4): 1266-1278.
- Norton, J. P. & M. A. Mulvey (2012). "Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*." PLoS Pathog **8**(10): e1002954.
- Ogura, T. & S. Hiraga (1983). "Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(15): 4784-4788.
- Pandey, D. P. & K. Gerdes (2005). "Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes." Nucleic Acids Res **33**(3): 966-976.
- Pedersen, K., A. V. Zavialov, M. Y. Pavlov, J. Elf, K. Gerdes & M. Ehrenberg (2003). "The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site." Cell **112**(1): 131-140.
- Putrinš, M., A. Ainelo, H. Ilves & R. Hörak (2011). "The ColRS system is essential for the hunger response of glucose-growing *Pseudomonas putida*." BMC Microbiol **11**: 170.
- Putrinš, M., H. Ilves, M. Kivisaar & R. Hörak (2008). "ColRS two-component system prevents lysis of subpopulation of glucose-grown *Pseudomonas putida*." Environ Microbiol **10**(10): 2886-2893.
- Rothenbacher, F. P., M. Suzuki, J. M. Hurley, T. J. Montville, T. J. Kirn, M. Ouyang & N. A. Woychik (2012). "Clostridium difficile MazF toxin exhibits selective, not global, mRNA cleavage." J Bacteriol **194**(13): 3464-3474.
- Saavedra De Bast, M., N. Mine & L. Van Melderren (2008). "Chromosomal toxin-antitoxin systems may act as antiaddiction modules." J Bacteriol **190**(13): 4603-4609.
- Sauer, R. T. & T. A. Baker (2011). "AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction." Annu Rev Biochem **80**: 587-612.
- Schifano, J. M., R. Edifor, J. D. Sharp, M. Ouyang, A. Konkimalla, R. N. Husson & N. A. Woychik (2013). "Mycobacterial toxin MazF-mt6 inhibits translation through cleavage of 23S rRNA at the ribosomal A site." Proc Natl Acad Sci U S A.

- Schumacher, M. A., K. M. Piro, W. Xu, S. Hansen, K. Lewis & R. G. Brennan (2009). "Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB." *Science* **323**(5912): 396-401.
- Schuster, C. F. & R. Bertram (2013). "Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate." *FEMS Microbiol Lett* **340**(2): 73-85.
- Schägger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." *Nat Protoc* **1**(1): 16-22.
- Shah, D., Z. Zhang, A. Khodursky, N. Kaldalu, K. Kurg & K. Lewis (2006). "Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*." *BMC Microbiol* **6**: 53.
- Shao, Y., E. M. Harrison, D. Bi, C. Tai, X. He, H. Y. Ou, K. Rajakumar & Z. Deng (2011). "TADB: a web-based resource for Type 2 toxin-antitoxin loci in bacteria and archaea." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D606-611.
- Studier, F. W. & B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**(1): 113-130.
- Zhang, J., Y. Zhang & M. Inouye (2003). "Characterization of the interactions within the mazEF addiction module of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **278**(34): 32300-32306.
- Zhang, Y. & M. Inouye (2009). "The inhibitory mechanism of protein synthesis by YoeB, an *Escherichia coli* toxin." *J Biol Chem* **284**(11): 6627-6638.
- Zhang, Y. & M. Inouye (2011). "RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation." *Mol Microbiol* **79**(6): 1418-1429.
- Zhang, Y., Y. Yamaguchi & M. Inouye (2009). "Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin." *J Biol Chem* **284**(38): 25522-25531.
- Tamman, H. (2012). *Pseudomonas putida* kasvukiirust vähendav toksiin GraT supresseerib *colR* mutandi glükoosõltuvat lüüsi. Magistritöö, Tartu ülikool.
- Tan, Q., N. Awano & M. Inouye (2011). "YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB." *Mol Microbiol* **79**(1): 109-118.
- Tian, Q. B., T. Hayashi, T. Murata & Y. Terawaki (1996). "Gene product identification and promoter analysis of *hig* locus of plasmid Rts1." *Biochem Biophys Res Commun* **225**(2): 679-684.
- Tian, Q. B., M. Ohnishi, T. Murata, K. Nakayama, Y. Terawaki & T. Hayashi (2001). "Specific protein-DNA and protein-protein interaction in the *hig* gene system, a plasmid-borne proteic killer gene system of plasmid Rts1." *Plasmid* **45**(2): 63-74.
- Wang, X., Y. Kim, S. H. Hong, Q. Ma, B. L. Brown, M. Pu, A. M. Tarone, M. J. Benedik, W. Peti, R. Page & T. K. Wood (2011). "Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response." *Nat Chem Biol* **7**(6): 359-366.
- Wang, X., D. M. Lord, H. Y. Cheng, D. O. Osbourne, S. H. Hong, V. Sanchez-Torres, C. Quiroga, K. Zheng, T. Herrmann, W. Peti, M. J. Benedik, R. Page & T. K. Wood (2012). "A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS." *Nat Chem Biol* **8**(10): 855-861.
- Vesper, O., S. Amitai, M. Belitsky, K. Byrgazov, A. C. Kaberdina, H. Engelberg-Kulka & I. Moll (2011). "Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*." *Cell* **147**(1): 147-157.
- Winsor, G. L., D. K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M. D. Whiteside, N. Y. Yu, R. E. Hancock & F. S. Brinkman (2011). "Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D596-600.
- Winther, K. S. & K. Gerdes (2011). "Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(18): 7403-7407.
- Winther, K. S. & K. Gerdes (2012). "Regulation of enteric *vapBC* transcription: induction by VapC toxin dimer-breaking." *Nucleic Acids Res* **40**(10): 4347-4357.

- Yamaguchi, Y. & M. Inouye (2011). "Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems." Nat Rev Microbiol **9**(11): 779-790.
- Yamaguchi, Y., J. H. Park & M. Inouye (2011). "Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea." Annu Rev Genet **45**: 61-79.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Andres Ainelu,

(sünnikuupäev: 11.02.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

*Pseudomonas putida* GraTA toksiin-antitoksiin süsteemi toimemehhanismide selgitamine,

mille juhendaja on Rita Hõrak, PhD,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **27.05.2016** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013